

University of Groningen

De ontwikkeling van het experimentele cervicovaginale carcinoom bij de muis.

Koudstaal, Johannes

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1965

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Koudstaal, J. (1965). *De ontwikkeling van het experimentele cervicovaginale carcinoom bij de muis.* [, Rijksuniversiteit Groningen]. [S.n.].

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

**DE ONTWIKKELING VAN HET
EXPERIMENTELE CERVICO-VAGINALE
CARCINOOM BIJ DE MUIS**

JOH. KOUDSTAAL

DE ONTWIKKELING VAN HET EXPERIMENTELE
CERVICO-VAGINALE CARCINOOM BIJ DE MUIS

STELLINGEN

I.

Er is een duidelijk morfologisch verschil in ontstaanswijze tussen het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom bij normale en bij met oestrogenen behandelde, gecastreerde muizen.

II.

De promotie-bevorderende werking van crotonolie op een kankerproces kan voor een deel verklaard worden door de eigenschap fibroblasten te induceren.

III.

Basale membraansubstantie op de grens epitheel-bindweefsel en om epitheliale tumoren wordt gevormd door epitheel- resp. epitheliale tumorcellen.

IV.

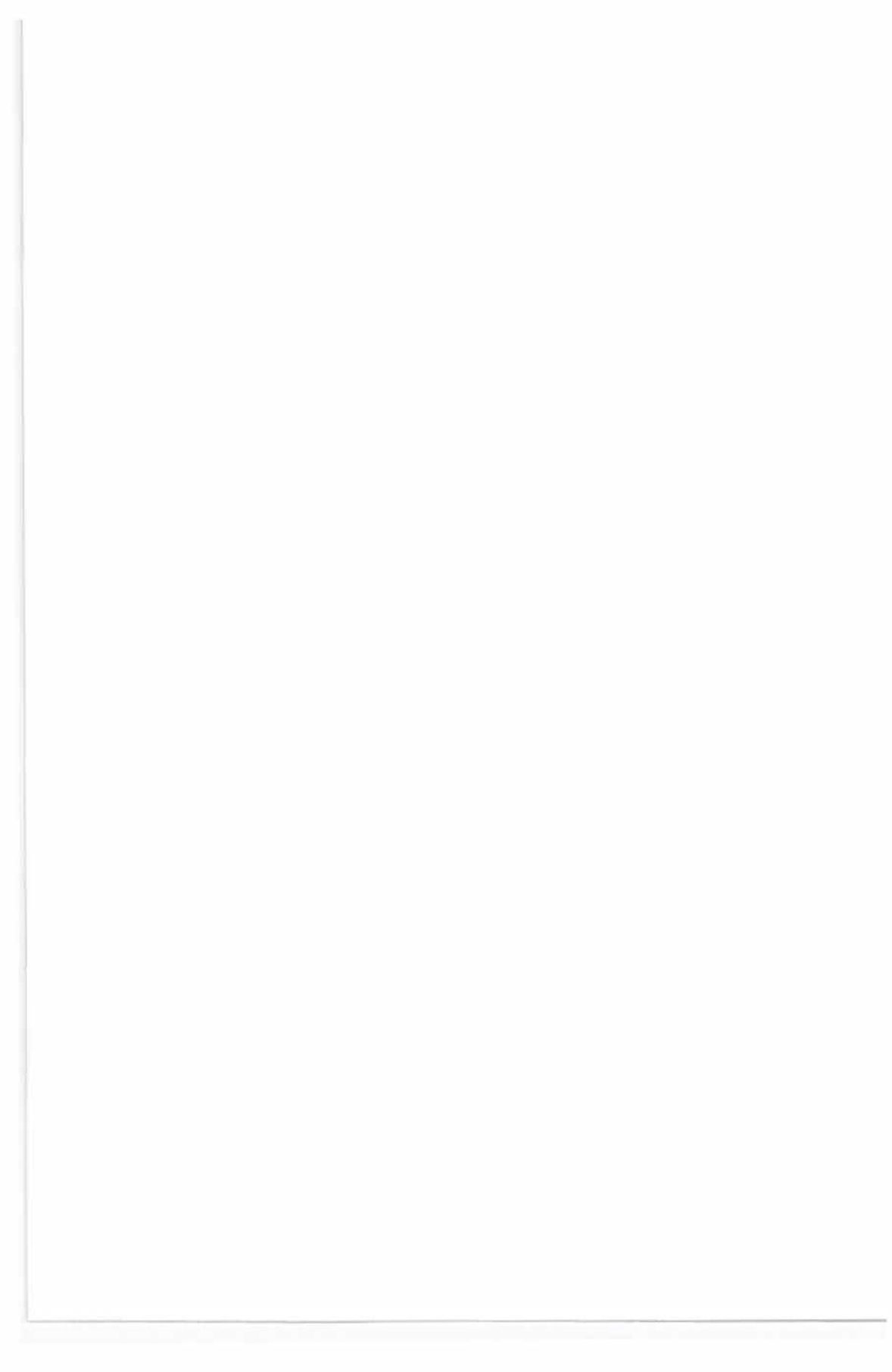
De afgenomen of verdwenen enzymactiviteit van alkalische fosfatase in granulocyten, die na stimulering in de bloedcirculatie verschijnen, is van diagnostisch belang bij de chronische myeloïde leucaemie.

V.

Een lage dosis Röntgenstralen op een tumor kan in bepaalde gevallen de metastasering van de tumor bevorderen.

VI.

Bij pasgeborenen met een ruimte innemend proces in de buik dient zonder uitstel laparotomie te geschieden.



VII.

Nieuwere inzichten in de ontstaanswijze van de hyaliene membranen ziekte maken het waarschijnlijk, dat het beter is te spreken van het pulmonale hypoperfusie syndroom.

VIII.

Bij onbegrepen diffuse longafwijkingen is, indien een lymfklierbiopsie geen diagnose heeft opgeleverd, een open longbiopsie van groot diagnostisch belang.

IX.

Het is niet juist het syndroom van Gianotti-Crosti te beschouwen als een vorm van cutane allergische vasculitis.

X.

De behandeling van een epitheliale botcyste dient primair te bestaan uit het uitkrabben van het aangetaste bot.

XI.

Orale ovulatie-remmende middelen („de pil”) dienen in ieder opzicht als geneesmiddelen beschouwd te worden.

XII.

Het is de taak van de overheid voorzieningen te treffen, waardoor cytologisch onderzoek van de portio uteri van alle vrouwen boven de 30 jaar jaarlijks mogelijk wordt, opdat ieder beginnend kankerproces van de baarmoederhals tijdig herkend zal worden.

XIII.

Voor een zuivere bepaling van het anti-oxydans butylhydroxytolueen in samengestelde bakkersvetten is de methode van BIEFER ongeschikt.
(Mitteilungen auf dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene 53, 243, 1962).

RIJKSUNIVERSITEIT TE GRONINGEN

DE ONTWIKKELING VAN HET
EXPERIMENTELE CERVICO-
VAGINALE CARCINOOM BIJ DE MUIS

THE DEVELOPMENT OF THE EXPERIMENTAL CERVICO-
VAGINAL CARCINOMA IN MICE

(with a summary in English)

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE

AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE GRONINGEN

OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS MR. E. H. S' JACOB,

HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER RECHTSGELEERDHEID,

IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 6 OKTOBER 1965

DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

JOHANNES KOUDSTAAL

GEBOREN TE PERNIS

1965

DRUKKERIJ VAN DENDEREN
GRONINGEN

Promotor: Prof. Dr. H. N. HADDERS

Aan mijn ouders

Aan Jeanne

Dit proefschrift is bewerkt in het Pathologisch Anatomisch Laboratorium (Prof. Dr. A. Arends en Prof. Dr. H. N. Hadders) te Groningen.

De verrichtingen in de proefdierenstal werden uitgevoerd met medewerking van de heren M. Venema, J. Roona en enige student-assistenten.

Mevr. A. Schubert-Danes verzorgde de paraffine-techniek en verrichtte de histochemische reacties. De enzymhistochemische kleurreacties werden uitgevoerd op de Afdeling Histochemie (Hoofd Dr. M. J. Hardonk) door de heer P. K. Houwing en Mej. H. G. A. de Boer.

De tekeningen werden vervaardigd door de heer D. Elzinga.

De microfotografie werd verricht op de Afdeling Medische Fotografie door J. J. Wachters, patholoog-anatoom.

Mej. G. H. Struik verzorgde het typewerk.

INHOUD

INLEIDING	1
HOOFDSTUK I	
Het kankerproces	3
Inleiding	3
A. Mechanismen verantwoordelijk voor het instandhouden van de normale weefselstructuur	4
a. intracellulaire regulatiemechanismen	4
b. intercellulaire regulatiemechanismen	7
c. het grensgebied tussen verschillende weefselsoorten	9
B. Stoornissen waardoor gezwelsgroei kan ontstaan	12
a. stoornissen van intracellulaire regulatiemechanismen	12
b. stoornissen van intercellulaire regulatiemechanismen	15
c. stoornissen van het grensgebied tussen weefselsoorten:	16
1. basale membraan	16
2. tumorbed	17
d. stoornissen van het immunologische apparaat	19
C. Begrippen in de experimentele cancerologie	20
HOOFDSTUK II	
Literatuuroverzicht van het experimentele cervico-vaginale carcinoom	27
Inleiding	27
A. Anatomie en fysiologie van het cervico-vaginale gebied van de muis	27
B. Het chemisch geïnduceerde cervico-vaginale carcinoom	32
a. tumor veroorzakende agentia	32
b. hormonale beïnvloeding van de carcinogenese	34
c. microscopisch waarneembare veranderingen	38
d. electronenmicroscopisch waarneembare veranderingen	39
e. histochemische veranderingen	40
f. enzymhistochemische veranderingen	41
HOOFDSTUK III	
Een morfologisch onderzoek van het zich ontwikkelende cervico-vaginale carcinoom bij muizen van de C ₃ H-stam met behulp van histo- en enzymhistochemische technieken	44
Inleiding	44
A. Materiaal en methodiek	45
B. Veranderingen van het vagina- en cervixslijmvlies bestudeerd aan de hand van de met haematoxyline-eosine gekleurde coupes	51
a. morfologische afwijkingen bij normale muizen	51
b. morfologische afwijkingen bij na ovariectomie met oestrogenen behandelde muizen	52

C.	Resultaten van het histochemische onderzoek	55
a.	histochemische bevindingen in het normale cervico-vaginale slijmvlies	55
b.	histochemische bijzonderheden van het zich ontwikkelende carcinoom	55
c.	histochemische bijzonderheden van de basale membraan en het bindweefsel gedurende de carcinogenese	56
D.	Resultaten van het enzymhistochemische onderzoek	57
a.	enzymhistochemische bevindingen in het normale cervico-vaginale slijmvlies	57
b.	enzymhistochemische bijzonderheden van het zich ontwikkelende carcinoom	60
E.	Bespreking der resultaten	64

HOOFDSTUK IV

	Enige factoren van invloed op de ontwikkeling van het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom bij muizen van de C ₃ H-stam	68
	Inleiding	68
A.	Materiaal en methodiek	68
B.	De invloed van het oplosmiddel chloroform in combinatie met oestrogenen op het zich ontwikkelende carcinoom	70
C.	De hoogte van het epitheel tijdens de eerste penseling van de portio uteri op het zich ontwikkelende carcinoom	72
D.	De invloed der geslachtshormonen op de ontwikkeling van het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom	73
E.	Conclusies	80

HOOFDSTUK V

	Beschouwing	82
SAMENVATTING	92
SUMMARY	98
FOTO'S	103
GERAADPLEEGBE LITERATUUR	127

Cancer may be defined as a *disorderly cellular growth*. We do not know the meaning of *order* on either the molecular or submolecular level. We do not know what a *cell* is, what this departmentalization of all higher forms of life means, nor do we know the mechanisms of *growth* and its regulation, so it is no small wonder that we do not understand cancer.

(A. Szent-Györgyi, 1961).

INLEIDING

De patholoog-anatoom wordt dagelijks geconfronteerd met de vraag of hij in een bepaald stukje weefsel aanwijzingen vindt voor kanker. De ervaring heeft geleerd dat gezwellen met bepaalde histologische kenmerken het dragende organisme tot de ondergang voeren. De aard van de behandeling is sterk afhankelijk van het oordeel van de patholoog-anatoom. Naarmate de therapeutische mogelijkheden toenamen werd het steeds belangrijker om zo nauwkeurig mogelijk te weten hoe een bepaald gezwel zich gedraagt.

Regelmatig blijkt de patholoog-anatoom niet in staat te zijn een absoluut antwoord te geven op de hierboven gestelde vraag, aangezien gebleken is dat er vloeiende overgangen bestaan tussen goed- en kwaadaardige processen. Daarbij komt dat het oordeel van de patholoog-anatoom principieel beperkt is omdat hij in het algemeen te weinig weet van de patient waarvan het gezwelweefsel afkomstig is. Een tumor kan namelijk waarschijnlijk nooit beschouwd worden als een in ieder opzicht autonoom proces, aangezien deze in meerdere of mindere mate afhankelijk is van het tumordragende organisme. Het ontstaan van een gezwel kan beschouwd worden als een uiting van een gestoord evenwicht tussen een aantal ontspoorde cellen en het organisme.

Verschillende mechanismen, die bij de carcinogenese van belang zijn, worden in hoofdstuk I besproken. Op talloze manieren is de carcinogenese te beïnvloeden, helaas meestal in ongunstige zin. Het hormonale milieu is soms van grote betekenis. Dit geldt vooral als er sprake is van een tumor, die uitgaat van cellen, die onder normale omstandigheden voor wat betreft hun groei en functie afhankelijk zijn van de aanwezigheid van hormonen.

In hoofdstuk II wordt een literatuuroverzicht gegeven over de invloed der geslachtshormonen op het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom bij verschillende proefdieren, in het bijzonder

bij de muis. De tumorgroei wordt bevorderd bij de muis door oestrogenen na ovariectomie.

Het doel van dit proefschrift is om de vraag te beantwoorden of er ook gedurende de carcinogenese morfologische aanwijzingen zouden zijn, die de snellere ontwikkeling zou kunnen verklaren.

Hoofdstuk III is hieraan gewijd. Het beschrijft de ontwikkeling van het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom bij normale muizen en bij muizen, die na castratie behandeld werden met oestrogenen. Histo- en enzymhistochemische reacties werden uitgevoerd om de morfologische veranderingen duidelijker te karakteriseren.

In hoofdstuk IV wordt nader ingegaan op enige factoren, die voor het ontstaan van de morfologische verschillen verantwoordelijk gesteld zouden kunnen worden. Vooral wordt aandacht geschonken aan de rol, die oestrogenen tijdens dit proces spelen. In dit verband wordt ook nagegaan of progesteron een bepaalde invloed uit zou kunnen oefenen op het carcinogenetische proces.

Hoofdstuk V wordt gewijd aan een beschouwing over de carcinogenese in het algemeen en verschillende mechanismen, waardoor oestrogenen een tumorproces zouden kunnen bevorderen.

De afstand tussen de experimenteel verkregen resultaten afkomstig van proefdieren en de klinische kennis van het carcinoom van de portio uteri bij de vrouw is te groot om bepaalde vaststaande conclusies te kunnen trekken. Het lijkt evenwel nuttig, om met het nodige voorbehoud, deze twee zo verschillende groepen van gegevens te vergelijken. Beide manieren van onderzoek kunnen resultaten opleveren waardoor de onderzoekers over en weer gestimuleerd worden de onderzoekingen betreffende het kankerprobleem des te gerichter voort te zetten.

HET KANKERPROCES

INLEIDING

Door het samenvloeien van zaad- en eicel ontstaat een zygote, waaruit zich een nieuw individu kan ontwikkelen. Al vrij spoedig zijn diverse soorten cellen waarneembaar, waaruit de verschillende weefsels en organen van het volwassen organisme ontstaan. Dit differentiatie-proces blijkt een zeer ingewikkeld gebeuren te zijn. Het is bekend, dat een deel der nieuwe weefselstructuren geïnduceerd wordt door zogenaamde evocatoren. Dit zijn stoffen, die door reeds aangelegde weefsels geproduceerd worden.

De kwantitatieve verhouding tussen de verschillende samenstellende delen van het organisme is onderhevig aan een zich voortdurend wijzigend evenwicht. In de volwassen toestand wordt dit evenwicht min of meer gestabiliseerd. Kleinere en grotere schommelingen blijven aanwezig, voorzover dit van belang is voor het instandhouden van het individu en de soort. Zo is er b.v. in de zwangerschap een beduidende groei van de baarmoeder en een toename van klierweefsel in de borstklieren. Gedurende pathologische processen b.v. bij ontsteking kan tijdelijk het aantal van één of meer celsoorten toenemen. Steeds keren na verloop van een zekere tijd de normale verhoudingen terug. Daarnaast zijn er evenwel processen, waarbij één of meer celsoorten dusdanig toenemen, dat het oude evenwicht niet meer hersteld lijkt te kunnen worden. Indien zich hierbij op een ander niveau een evenwichtstoestand instelt, welke een stabiel karakter lijkt te hebben, spreekt men van *goedaardige gezwelgroei*. Het blijkt evenwel, dat soms een evenwicht bereikt wordt, dat na kortere of langere tijd opnieuw doorbroken wordt. Indien de balans overslaat naar de woekerende celsoort ontwikkelt zich *kwaadaardige gezwelgroei*.

Voortdurend poogt het lichaam opnieuw een evenwicht te scheppen. Dit mislukt echter bijna steeds. Bij wijze van zeer grote uit-

zondering blijkt het lichaam, zelfs bij uitgebreide woekering van tumor, te kunnen overwinnen (WOODRUFF, 1964).

Aangezien altijd sprake is van een gestoord evenwicht, dat aan de ene zijde beïnvloed wordt door het organisme en aan de andere zijde door een bepaalde ontspoorde celsoort is het begrijpelijk dat er vloeiende overgangen bestaan tussen goed- en kwaadaardige processen.

Daar gezwelgroei een uiting is van een gestoord regulatiemechanisme, zal eerst nagegaan worden wat er bekend is over de verschillende mechanismen, die onder normale omstandigheden het evenwicht in het lichaam handhaven.

A. MECHANISMEN VERANTWOORDELIJK VOOR HET INSTANDHOUDEN VAN DE NORMALE WEEFSELSTRUCTUUR

a. *Intracellulaire regulatiemechanismen*

Vrijwel alle chemische reacties in de cel worden gekatalyseerd door enzymen, die in het cytoplasma gevormd worden. Het is dus van belang na te gaan welke factoren bepalen hoe en waarom bepaalde enzymen gevormd worden. De kennis hieromtrent stamt voornamelijk uit de microbiologie (JACOB en MONOD, 1961, 1962; GROS 1964).

Het genoom van de zygote schijnt het gehele repertoire van de genetische informatie te bevatten voor de synthese van alle eiwitten van het organisme. Het is het meest waarschijnlijk, dat deze informatie gedurende de ontwikkeling evenredig verdeeld wordt over de cellen der verschillende weefsels. Slechts enkele delen van de genetische informatie vinden hun expressie in de diverse weefselsoorten. Het gehele ontwikkelingsproces kan in genetische termen uitgedrukt worden als inductie, activering of derepressie van verschillende genen in de verschillende cellen (FELDMAN, YAFFE en GLOBERSON, 1964). De genetische informatie, waarover een cel beschikt, ligt verankerd in de desoxyribonucleïnezuren van de kern. Het DNZ is een macromolecuul, dat opgebouwd is uit twee complementaire ketens, die spiraalsgewijs om elkaar heen gewonden zijn (WATSON en CRICK, 1957). Nucleïnezuren zijn ketens opgebouwd uit nucleotiden, die samengesteld zijn uit:

- a. base. Dit kan een purine, nl. adenine of guanine zijn of een pyrimidine, nl. cytosine en thymine in DNZ en cytosine en uracil in RNZ.

- b. pentose (desoxyribose of ribose, resp. in DNZ en RNZ).
- c. fosforzuur.

De nucleotiden zijn met elkaar verbonden door fosforzuurbruggen tussen de pentosen. In de complementaire ketens liggen steeds adenine en thymine resp. cytosine en guanine tegenover elkaar en omgekeerd. In de cellen der zoogdieren worden twee soorten nucleinezuren aangetroffen, het DNZ en het RNZ. Deze zijn van groot belang voor de eiwitsynthese van de cel. De aminozuurvolgorde in een eiwit wordt bepaald door de base-volgorde in het DNZ.

Hoe dit proces geregeld wordt is na te gaan aan de hand van het schema (fig. 1), dat PITOT en HEIDELBERGER (1963) opstelden met behulp van de gegevens van JACOB en MONOD.

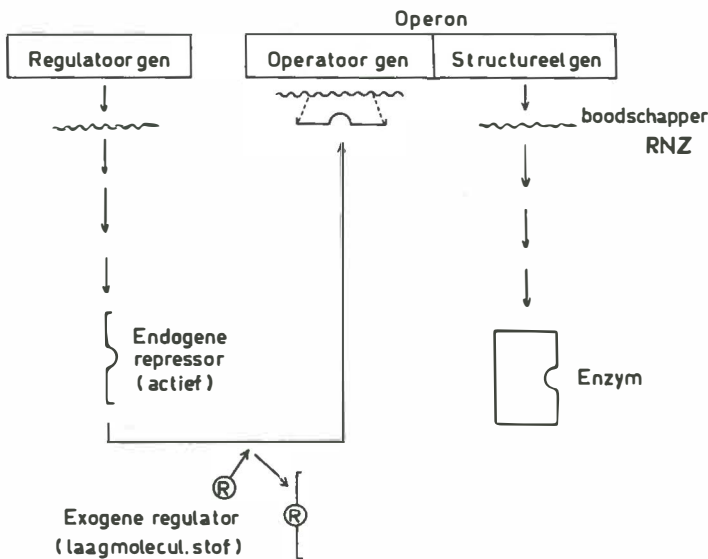


Fig. 1

Het intracellulaire regulatiemechanisme volgens Pitot en Heidelberg (1963) naar gegevens van Jacob en Monod

Links bevindt zich het regulator gen. Rechts is de functionele eenheid, het operon genoemd, dat opgebouwd is uit een operatoor gen met daarnaast één of meer structurele genen, waarin de structurele informatie van het enzym eiwit vervat is. Het gen (een stukje DNZ) werkt als een matrijs voor de synthese van een complemen-

taire keten RNZ, het zogenaamde boodschapper RNZ. Dit gebeurt onder invloed van een RNZ-polymerase (HURWITZ en AUGUST, 1963). Het gevormde boodschapper RNZ raakt los en gaat naar het cytoplasma, waar het zich hecht aan die celementen, die de eiwitsynthese verzorgen, de zgn. ribosomen. Ze vormen tezamen een ribosomen-RNZ-aggregaat, dat op zijn beurt werkt als matrijs voor de complexen, die bestaan uit het zgn. overdragende RNZ uit het cytoplasma en aminozuren.

Er is nog een derde soort RNZ (WATSON, 1963) dat in de ribosomen voorkomt, maar waarover weinig bekend is. Alle drie soorten worden waarschijnlijk in de kern gemaakt.

Tussen de verschillende, door het RNZ gerangschikte aminozuren treden peptide-bindingen op en het gevormde eiwit raakt los van de matrijs (WATSON, 1963). Dit complexe gebeuren in het cytoplasma wordt in het schema weergegeven door drie pijltjes.

Men stelt zich voor, dat het regulator gen zijn eigen boodschapper RNZ maakt, dat op zijn beurt de synthese van een endogene repressor induceert. Deze repressor gaat normaal naar de kern en hecht zich aan het operator gen. Dit gen wordt nu geblokkeerd en dit betekent, dat de daaraan gekoppelde structurele genen niet meer in staat zijn hun boodschapper RNZ te vormen. Hoewel de exacte structuur van de endogene repressor niet precies bekend is, is het waarschijnlijk een eiwit. MONOD e.a. (1963) vinden het niet onwaarschijnlijk, dat repressoren allosterische eiwitten zijn. Dit betekent dat een wijziging in de ruimtelijke structuur gevolgd kan worden door een inactivering van de repressor. Deze wijziging wordt veroorzaakt door laag-moleculaire stoffen (R), de zgn. exogene regulatoren.

Er zijn overeenkomstige systemen, waarbij de door het regulator gen bepaalde cytoplasmatische stof inactief is. Door een van buitenaf inwerkende stof kan deze substantie op dezelfde wijze geactiveerd worden.

Het beschreven mechanisme handelt voornamelijk over een toe- of afname van de produktie van enzymen. Als enzymen eenmaal gevormd zijn wordt hun activiteit verder beïnvloed door intra-cytoplasmatische stoffen, die eventueel betrokken kunnen zijn bij chemische reacties, die door het enzym gekatalyseerd worden.

b. *Intercellulaire regulatiemechanismen*

In ieder volwassen weefsel bestaat een nauwkeurig evenwicht tussen aanmaak en afbraak van cellen. Er moeten dus regulatiemechanismen zijn, die het evenwicht handhaven. JACOB en MONOD hebben begrijpelijk gemaakt dat het metabolisme van een cel beïnvloed kan worden door van buitenaf ingrijpende laag-moleculaire stoffen. Een cel kan dus door een signaal van buiten bepaalde eiwitten gaan produceren, benodigd voor een deling of op een ander signaal andere eiwitten vereist voor een zekere functie.

Aan het einde van de vroege interfase, de dichofase, valt de beslissing of een cel gaat delen of differentieren. Het is duidelijk, dat dit de belangrijkste fase is in de levenscyclus van een cel, zoals vooral door BULLOUGH (1964) naar voren is gebracht. Deze auteur beschreef de resultaten van zijn onderzoeken over factoren in de huid van de muis, die de celdelingsactiviteit bepalen. Het bleek, dat de deling van een epidermiscel geremd werd door adrenaline. De activiteit van adrenaline was wel weefselspecifiek, maar niet specifiek wat het effect op de celdeling betrof. De conclusie was, dat in de epidermis een bepaalde substantie voorkomt, specifiek voor de epidermis, die samen met adrenaline remmend werkt op de celdeling.

Opvallend is, dat hier sprake is van een stof, die onder normale omstandigheden de celdeling remt. BULLOUGH (1964) formuleerde dit aldus: „it is in the nature of cells to prepare for and to undergo mitosis when ever they are not prevented. . . . opportunity, not stimulus, is all needed for cell division”. Een dergelijke stof behoort tot de produkten van het endocriene apparaat. Aangezien deze zijn functie uitoefent in het weefsel, waarin het gevormd wordt, kan men het geen hormoon noemen. BULLOUGH stelde de naam chalon voor. Het bleek dat deze stof een eiwit is of er in ieder geval onder normale omstandigheden hecht mee verbonden is. Het werd duidelijk dat het chalon-adrenaline complex niet stabiel is, maar in evenwicht verkeert met het vrije chalon en het vrij voorkomende adrenaline.

De celdeling in de epidermis van de muis, die voornamelijk voorkomt in het stratum basale (IVERSEN, 1964), wordt dus geremd door het complex: chalon-adrenaline.

De indruk bestaat dat b.v. in de epidermis iedere cel normaal in staat is om slechts twee belangrijke synthetische programma's uit te voeren. Ongedifferentieerde cellen maken eiwitten, die nodig zijn

voor de celdeling. Differentierende en gedifferentieerde cellen produceren eiwitten, die nodig zijn voor de structuur en de functie van het weefsel. Het is duidelijk dat in de epidermis het chalon-adrenaline complex bepaalt welk programma uitgevoerd zal worden.

IVERSEN (1964) stelde een schema op (fig. 2) waaruit blijkt dat in de differentierende cellen van de epidermis van de muis een stof gevormd wordt, die de celdeling in het stratum basale remt. Als door

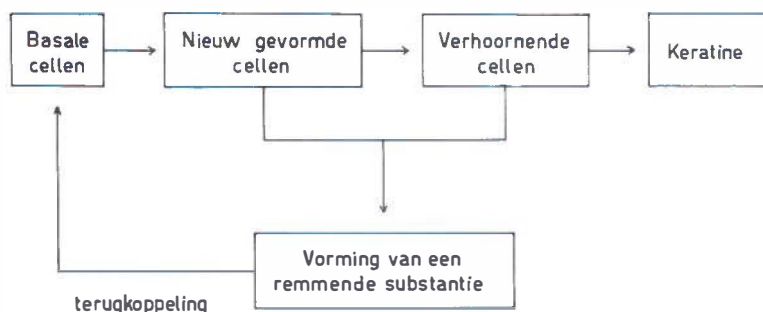


Fig. 2

Het intercellulaire regulatiemechanisme van de huid van de muis volgens Iversen (1964).

het normale verlies van differentierende cellen de remmende stof minder wordt, neemt het aantal celdelingen toe. Indien daarentegen het aantal differentierende cellen toeneemt, vermindert de mitose-activiteit. Er is dus in de huid van de muis sprake van een terugkoppelingsmechanisme.

Mogelijk is de door IVERSEN veronderstelde factor identiek aan het chalon van Bullough. IVERSEN was niet in staat het aandeel van adrenaline in het regulatiemechanisme te bevestigen.

De conclusie is dus dat het mogelijk is dat differentierende cellen chalonen produceren, die al of niet in combinatie met een andere stof de celdeling remmen.

Het is voorstelbaar dat gepoogd is de kennis van de intra- en intercellulaire regulatiemechanismen met elkaar in verband te brengen. Om het groei- en differentiatieprobleem begrijpelijk te maken onderscheidde BULLOUGH (1964) een „mitose-operon” en een „keratine-operon”. Het eerste bevat de genetische informatie voor de enzymen benodigd voor de celdeling, het tweede voor de enzymen, vereist voor de vorming van een gedifferentieerd produkt, het kera-

tine. Aangezien een cel niet tegelijkertijd kan delen en differentieren (SWANN, 1958) moet het ene operon geblokkeerd zijn als het andere functioneert. Vanuit theoretisch oogpunt is het het meest waarschijnlijk, dat het regulator gen voor de celdeling een onderdeel vormt van het „keratine-operon” (fig. 3). Zodra de cel gaat differentieren wordt het „keratine-operon” ontkoppeld en wordt dus de repressor voor het „mitose-operon” gevormd, zodat de enzymen die benodigd zijn voor het celdelingsproces niet geproduceerd kunnen worden.

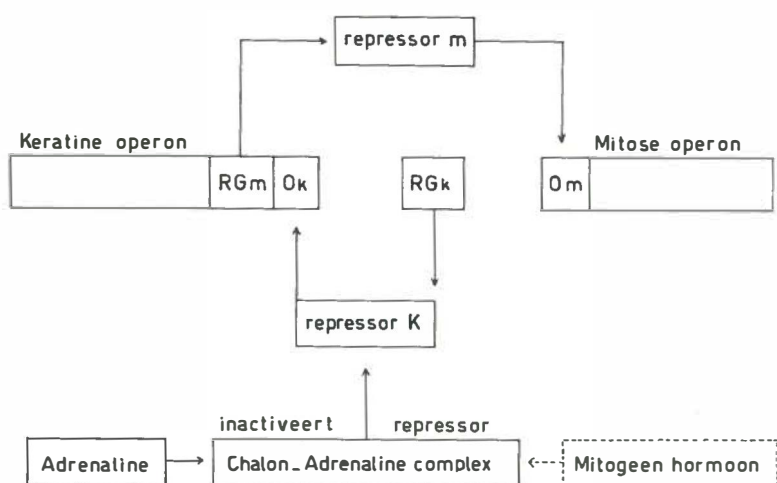


Fig. 3

Intra- en intercellulaire regulatiemechanismen van de huid van de muis volgens Bullough (1964).

BULLOUGH (1964) stelt zich nu voor, dat de repressor K van het „keratine-operon” geïnactiveerd wordt door het chalon-adrenaline complex.

In deze hypothetische gedachtengang neemt BULLOUGH blijkbaar aan dat de repressor, waarschijnlijk een eiwit, geïnactiveerd wordt door mogelijk een ander eiwit, het chalon-adrenaline complex.

c. Het grensgebied tussen verschillende weefselsoorten

Aangezien het kankerproces morfologisch vooral gekenmerkt wordt door een ernstige blijvende beschadiging van het grensgebied tussen

diverse weefselsoorten zal dit gebied eerst onder normale en licht afwijkende omstandigheden besproken worden.

Daar dit proefschrift zich vooral zal bezighouden met de grens epitheel-bindweefsel zal hier de meeste aandacht aan gegeven worden.

In bepaalde organen wordt tussen het epitheel en het bindweefsel een ononderbroken, structuurloze laag, die scherp afgegrensd lijkt tegenover het epitheel en het aangrenzende stroma, aangetroffen. Dit laagje werd basale membraan genoemd. Naarmate de histochemie vorderde werden kleurtechnieken ontwikkeld, waarmee ook op plaatsen, welke met de haematoxyline-eosine kleuring geen membraan te zien gaven, een duidelijk laagje te onderscheiden was. Daarom werd vervolgens de basale membraan gedefinieerd als een dicht netwerk van argyrofiele vezels, waartussen zich een PAS (Periodic Acid Schiff) positieve substantie bevond. De samenstellende delen kunnen wat de hoeveelheid betreft ten opzichte van elkaar variëren.

Met het electronenmicroscopie wordt op de grens epitheel-bindweefsel een golvende, de celgrenzen volgende, ongeveer 400 Å dikke membraan aangetroffen (PEASE, 1960). Ook deze grenslijn wordt aangeduid met basale membraan. ASHWORTH e.a. (1961) menen, dat er geen principieel verschil bestaat tussen de licht- en electronenmicroscopische basale membraan. Met de histochemische technieken zouden namelijk stoffen zichtbaar worden, die naast de electronenmicroscopische basale membraan gelegen zijn. Andere onderzoekers onderstrepen het verschil tot in de terminologie (SALPETER en SINGER, 1960). Deze auteurs noemen de electronenmicroscopische membraan ad-epidermale membraan. Het zijn verschillende structuren, die waarschijnlijk onder fysiologische en pathologische omstandigheden veelal gelijk zullen reageren.

GERSH en CATCHPOLE (1949) beschouwen de basale membraan als een verdichting van de grondsubstantie. Ze zijn vertegenwoordigers van de onderzoekers, die een dergelijke genese voorstaan. Gedurende de laatste jaren zijn verschillende gegevens naar voren gekomen, die erop duiden dat ook zeker de epitheelcel een rol kan spelen bij de vorming van de basale membraan. BOSS (1963) vond met behulp van een immuno-fluorescentie methode, dat er in het lichaam diffuus verspreid stoffen voorkomen, die een gemeenschappelijk antigeen be-

vatten. Ze zijn aanwezig in basale membranen, argyrofiele vezels, sarcolemma en neurilemma.

PIERCE e.a. (1963) wekten met een hyaliene substantie uit een tumor antilichamen op, die zich hechtten aan basale membranen. Eerst werd het antilichamen bevattende serum bewerkt met miltweefsel. Daarna bleef slechts een deel der antilichamen over, die zich alleen hechtten aan basale membranen, die tegen epitheel gelegen waren. De conclusie was, dat de basale membraan onder epitheel gevormd wordt door het endoplasmatische reticulum van epitheelcellen. Het is waarschijnlijk dat zowel het epitheel als het bindweefsel aan de vorming van de grenslaag deel hebben.

Aangezien veranderingen in het grensgebied onder normale en pathologische omstandigheden, die niet samenhangen met gezwelligheid, het inzicht in de carcinogenese toch zouden kunnen verdiepen, zullen verschillende onderzoeken worden gerefereerd.

Als men intradermaal terpentijn injecteert treedt een ontstekingsreactie op (GERSH en CATCHPOLE, 1949). Gedurende de eerste twee dagen kan de PAS-positieve basale membraan breder of dunner en eventueel afgebroken worden. De basale membraan kan zelfs geheel verdwijnen. De auteurs schreven de verbreding van de basale membraan toe aan een gedeeltelijke depolymerisatie en het verdwijnen aan een totale depolymerisatie van de grondsubstantie. SALPETER en SINGER (1960) bestudeerden met het elektronenmicroscop de vorming van de basale membraan in een regenererende poot van een salamander. Onder het eerst gevormde oppervlakte epitheel was geen duidelijke membraan waarneembaar. Als de regeneratie voortschrijdt ontstaat een basale membraan tegelijkertijd met of voorafgaande aan de vorming van reticulinevezels. Aanvankelijk is de gevormde membraan nog dun en onderbroken. In dit gebied worden uitstulpingen van het cytoplasma der epitheelcellen in het stroma waargenomen.

Verschuivingen tussen epitheel en bindweefsel kunnen fysiologisch voorkomen. Dit proces werd bestudeerd in de mamma van de muis gedurende de zwangerschap en de lactatieperiode door TOUSTANOVSKY en VASILIEV (1957). Voordat het epitheel gaat groeien vindt vorming van een „bed” plaats, dat bestaat uit jong bindweefsel.

Ook onder pathologische omstandigheden kan dit verschijnsel tot uiting komen. ZAWARSIN en medewerkers (1925, 1927) implanteerden stukjes celloidine in de subcutis. Rondom deze elementen ontstond

jong bindweefsel, waarin het aangrenzende epitheel infiltreerde. FISCHER (1906) bracht olijfolie in de subcutis van het oor van een konijn. Er trad een ontstekingsreactie op, waarbij vooral oedemateus, jong bindweefsel ontstond. Indien echter scharlakenrood in de olijfolie aanwezig was, infiltreerde het aangrenzende epitheel in het pas gevormde bindweefsel. Het bleek dus, dat de kleurstof essentieel was voor het verbreken van het normale evenwicht tussen epitheel en bindweefsel. Hoewel de onderzoeker zelfs in één geval een epitheelhaardje in een lymfevat aantrof, gingen de afwijkingen, die histologisch niet te onderscheiden waren van plaveiselcelcarcinoom in regressie.

Uit deze gegevens blijkt, dat de vorming van een bindweefselbed aan de invasieve groei van een goedaardige epitheelwoekering voorafgaat.

De beschreven fysiologische en pathologische processen zijn goedaardig, omdat na verloop van tijd het normale evenwicht hersteld wordt.

B. STOORNISSEN WAARDOOR GEZWELGROEI KAN ONTSTAAN

Indien de regulatiemechanismen voor het normale evenwicht dat bestaat tussen verschillende weefselementen in hun functie tekortschieten is de mogelijkheid tot gezwelgroei geschapen. In het algemeen zijn er meerdere factoren nodig om de omstandigheden te scheppen, waarin een bepaald weefselement zich min of meer ongebreideld kan vermeerderen.

a. *Stoornissen van intracellulaire regulatiemechanismen*

De kankercel is gekenmerkt doordat de expressie van de delingspotentie irreversibel gestabiliseerd is (EMMELOT, 1963). Dit houdt niet in dat tegelijkertijd de delingsactiviteit van kankercellen verhoogd is. MENDELSON (1962) constateerde dat de periode die gelegen is tussen twee delingen van kankercellen extreem lang kan zijn. Dit is ook af te leiden uit de waarnemingen van FISHER en FISHER (1959). Als men Walker 256 carcinosarcomacellen bij ratten in de vena portae spuit vindt men zelfs na 5 maanden nog geen levertumoren. Wanneer echter de ratten 3 maanden na de injectie regelmatig een laparotomie ondergingen, waarbij aan de lever gemani-

puleerd werd, ontstonden binnen korte tijd bij alle ratten lever-tumoren. Het bleek dus dat tumorcellen een zeer lange periode in rustende toestand aanwezig geweest waren. Wijziging in de omstandigheden werd gevolgd door een ongebreidelde tumorgroei.

De irreversibele veranderingen, die tijdens de carcinogenese in de cel ontstonden zocht men in het DNZ van de kern. De somatische mutatie-theorie (BAUER, 1928, 1949) is hierop gegrondvest. Indien veranderingen van de desoxyribonucleinezuren overgedragen worden aan dochtercellen is een mutatie ontstaan. Tijdens de carcinogenese worden blijkbaar die delen van het DNZ stuk gemaakt, die nodig zijn voor de differentiatie van de cel. Uiteraard blijven de delen, die essentieel zijn voor de deling intact. DANNENBERG (1963) bespreekt uitvoerig de werking van kankerverwekkende agentia vanuit dit gezichtspunt. Behalve een verandering van het celgenoom bestaat de mogelijkheid dat nieuw genetisch materiaal aangevoerd wordt. Het laatste gebeuren kan men geen mutatie noemen, maar wel transformatie, transductie of conversie (POTTER, 1964).

Nog steeds heerst geen eenstemmigheid over de vraag, waar het primaire aangrijpingspunt der carcinogenen gelegen is, in het cytoplasma of in de kern. Met behulp van de weefselkweektechniek toonden ALLISON en MALLUCI (1964) aan dat polycyclische koolwaterstoffen in lysosomen terecht komen. Behalve voor enkele carcinogene koolwaterstoffen werd dit gebeuren ook voor een niet-carcinogene stof, nl. anthraceen aangetoond. Zij veronderstellen de mogelijkheid dat geleidelijk enzymen uit de aangetaste lysosomen in het cytoplasma terecht komen, die stoornissen van het regulatiemechanisme van de cel tot gevolg hebben.

MILLER en MILLER (1947) vonden dat vele katabole enzymen, die normaal in leverweefsel voorkomen, verdwenen zijn uit levergezwellen. Meerdere onderzoekers toonden aan, dat polycyclische koolwaterstoffen gebonden worden aan eiwitten en met deze uit de cel verdwenen (MILLER en MILLER, 1961; ABELL en HEIDELBERGER (1963). Uitgaande van deze gegevens stelden PITOT en HEIDELBERGER (1963) een schema op, waaruit blijkt, dat een cytoplasmatische verandering overgedragen kan worden aan dochtercellen (fig. 4).

In dit schema voorkomt het actieve repressorprodukt van RG_2 de synthese van E door blokkering van het bijpassende operon. Zodra de repressor van RG_2 geïnactiveerd wordt door een carcinogeen wordt

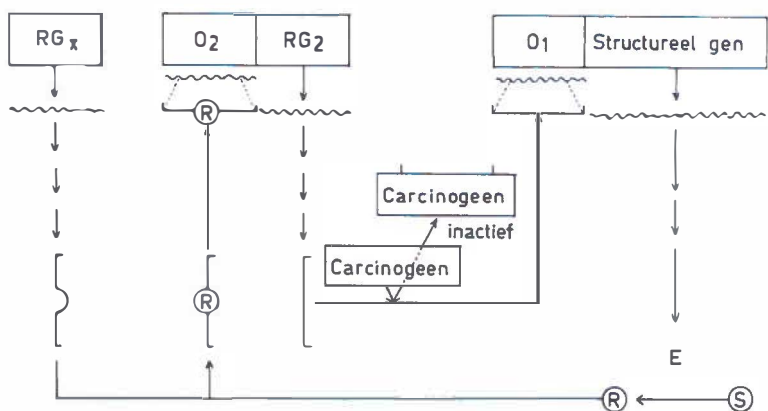


Fig. 4

Intra-cytoplasmatische veranderingen kunnen tumorgroei tot gevolg hebben (Pitot en Heidelberger, 1963).

E gesynthetiseerd, zodat uit het altijd aanwezige substraat S de stof R gevormd wordt. Dit produkt R inactieveert de repressor, die door RG_x bepaald wordt. Operon 2, waarin het regulator gen van operon 1 voorkomt wordt nu ontkoppeld, zodat het enzym E ongelimiteerd gesynthetiseerd kan worden. Als E een enzym is, dat bij de groei van cellen betrokken is, kan men zich voorstellen dat een ongebreidelde groei plaats vindt. Aangezien het produkt R bij de deling in beide dochtercellen terecht komt blijft de ontremming van operon 1 bestaan. De aanwezigheid van het carcinogeen is niet meer nodig. Indien het eiwit, waaraan het carcinogeen gebonden wordt de repressor van RG_2 zou blijken te zijn, zou dit een krachtige steun zijn voor de „deletion” hypothese. De onderzoekers wijzen er met nadruk op, dat hun voorstelling van zaken alleen betrekking heeft op de beginstadia van de carcinogenese. POTTER (1964) oefent kritiek uit op de laatste opmerking, aangezien uit de experimentele pathologie duidelijk gebleken is, dat contact met carcinogenen in het algemeen zeker niet direct gevolgd wordt door tumorgroei. Een overeenkomstig mechanisme zou eventueel wel een rol kunnen spelen bij de tumorgroei. Het carcinogeen behoeft dan niet meer aanwezig te zijn. Het is evenwel mogelijk, dat tijdens de periode van groei andere factoren de repressor van RG_2 inactiveren.

Er is een vrij sterk argument door BROOKES en LAWLEY (1964)

naar voren gebracht, waaruit blijkt dat het primaire aangrijpingspunt van een carcinogeen niet in het cytoplasma, maar in de kern gelegen is. Zij gingen de binding na van radioactief gemerkte kankerverwekkende stoffen met eiwitten, RNZ en DNZ. Het bleek, dat de maximale binding plaats vond na 24 tot 48 uur. Dertig dagen na de penseling kon nog 9,10-dimethyl-1,2-benzanthraceen aangetoond worden. De binding, die ontstaan was met RNZ en eiwitten toonde geen positieve correlatie met de potentie der carcinogenen. Hoewel de hoeveelheid aan DNZ gebonden bijzonder gering was, bleek een verband met de kankerverwekkende potentie van de desbetreffende stoffen. Deze gegevens steunen de opvatting, dat de essentiële stap bij de kankerontwikkeling bestaat uit een mutatie of een reeks van mutaties veroorzaakt door het carcinogeen (HADDOW, 1958).

b. Stoornissen van intercellulaire regulatiemechanismen

IVERSEN (1964) bestudeerde de verschijnselen, die in de huid van de muis na één keer penselen met 3-methylcholanthreen ontstaan. Het initiële effect bestond uit een kortdurende blokkering van de DNZ synthese en het delingsproces. Daarna werd een sterk toegenomen proliferatie van basale cellen waargenomen.

Deze periode duurde ongeveer 4 à 5 dagen; de celdelingsactiviteit was na deze tijd weer normaal. Het bleek, dat niet alleen differentierende cellen, maar ook sommige cellen, die tijdens de eerste snelle proliferatiefase ontstonden irreversibel beschadigd waren. Als dode cellen werden ze eerder geëlimineerd dan normaal. Twee snel optredende effecten van het carcinogeen werden vastgesteld: ten eerste celbeschadiging en ten tweede celproliferatie. Overeenkomstige verschijnselen werden ook waargenomen in de subcutis (VASILIEV e.a. 1962) en in de lever (DAOUST, 1963).

Men kan dus concluderen dat door het carcinogeen een verschuiving optreedt in de celpopulatie naar een generatie van jonge cellen. IVERSEN meent, dat het primaire effect van het carcinogeen een celbeschadiging is en de daarop volgende hyperplasie een gevolg daarvan. Reeds DEELMAN (1924) legde het accent op de regeneratieve processen, die na kankerverwekkende stoffen kunnen verschijnen. Als men vanuit dit gezichtspunt, waarin vervat het normale regulatiemechanisme in de epidermis zoals opgesteld door IVERSEN (fig. 2), de carcinogenese wil verklaren dan zijn er verschillende mogelijkheden:

1. De differentierende cellen gaan te weinig remmende stof produceren.
2. De basale cel wordt ongevoelig voor de remmende stof. Men moet hier aannemen dat de verworven ongevoeligheid overgaat op de dochtercellen.
3. De remmende stof kan de basale cel niet meer bereiken.

De opvatting van BULLOUGH (1964) sluit hierop aan. Indien de hoeveelheid chalone afgenomen is, leidt dit niet alleen tot een toename van de celproliferatie, maar ook tot een verlies van differentiatie. In vrijwel alle tumoren ziet men een sterke stoornis van de differentiatie, zodat dit in overeenstemming is met deze voorstelling. Slechts een geringe daling in de produktie van de chalone leidt onherroepelijk tot een locale toename van weefsel. De groeisnelheid behoeft hierbij zeker niet toegenomen te zijn. Soms is de periode tussen twee delingen zelfs extreem lang (MENDELSON, 1962).

Zowel IVERSEN als BULLOUGH leggen dus sterk het accent op een gestoorde interactie van differentierende en ongedifferentieerde cellen.

In verband met deze zienswijze wordt de omschrijving van een tumorproces van POEL (1964) vermeld: „A tumor is the biological product of a physiological state in which inadequate intercellular controls permit some normal cells to proliferate, uninhibited by the homeostatic restrictions of related cells”.

c. Stoornissen van het grensgebied tussen weefselsoorten

1. *Basale membraan.* Vooral in de gynaecologische literatuur is veel aandacht geschonken aan het al of niet doorbroken zijn van de basale membraan als criterium voor invasieve groei (o.a. THIERY, 1962; SIRTORI en MORANO, 1963). Noch de PAS-techniek, noch het zichtbaar maken van argyrofiele vezels zou geschikt zijn om een absoluut oordeel te geven over het al of niet aanwezig zijn van een infiltrerende tumor. Belangwekkende onderzoeken zijn de laatste jaren verricht met behulp van het electronmicroscop. ASHWORTH e.a. (1961) bestudeerden het intra-epitheliale en het infiltrerende carcinoom van de portio uteri bij de mens en schonken vooral aandacht aan de grens tussen epitheel en stroma. De onder normale omstandigheden golvend verlopende ba-

sale membraan bleek bij het carcinoma in situ gestrekt te zijn. Bij het infiltrerende carcinoom waren losgelegen celgroepjes deels niet, deels wel omgeven door een basale membraan. Om de laatst genoemde celgroepjes was blijkbaar een nieuwe basale membraan gevormd. Met histochemische technieken (PAS, Alcian Blue en colloïdale ijzerkleuring) werden de stoornissen in het grensgebied bevestigd. Het vroegste invasieve stadium bleek te bestaan uit kleine breuken van de basale membraan, waardoor protoplasma van de epitheelcel pulde. De onderzoekers veronderstelden, dat vorming van een nieuwe basale membraan om een deel van de geïnfilteerde groepjes cellen een zekere rusttoestand van de tumor weerspiegelde. Ze bestudeerden ook de basale membraan van andere menselijke tumoren en vonden zelfs om metastasen basale membranen. SIRTORI en MORANO (1963) beschreven de vorming van een basale membraan om metastasen in lymfeklieren, die zij aantoonde met een zilverkleuring. FREI (1962) verrichtte een electronenmicroscopisch onderzoek van het bij muizen opgewekte huidcarcinoom met 9,10-dimethyl-1,2-benzanthraceen. Ook hij constateerde breuken van de basale membraan. De mogelijkheid bestaat, dat de basale membraan geen tred houdt met de tumorgroei. In het laatste geval zal door een mechanisch gebeuren de basale membraan op een bepaald ogenblik doorbroken worden.

2. Tumor bed. Hoewel de essentiële veranderingen bij de kankerontwikkeling hoogst waarschijnlijk in de kankercel plaats vinden, zullen er ook andere factoren aanwezig moeten zijn, voordat tumorgroei optreedt met zijn desastreuze gevolgen. Een der meest sprekende uitingen van kwaadaardige gezwelgroei is de metastasering. Het normale evenwicht tussen verschillende weefsels wordt hierbij grondig verstoord. Celgroepjes raken van de primaire tumor los, worden versleept, zetten zich vast, vermeederen zich en groeien tenslotte uit tot tumoren elders in het lichaam los van de primaire tumor. Belangwekkende Nederlandse studies over het metastaseringsproces verschenen van de hand van WIEBERDINK (1950) en van VAN DONGEN (1961). Een der eerste voorwaarden voor het ontstaan van metastasen is infiltratie in het omgevende weefsel (ZEIDMAN, 1957). Sommige waarnemingen tonen aan, dat gedurende de infiltratieve groei een complexe wisselwerking bestaat tussen de tumor en het omgevende weefsel. Proliferatie van bindweefsel speelt daarbij een

belangrijke rol (VASILIEV, 1958). FISCHER e.a. (1929) toonden aan, dat fibroblasten van de muis in staat zijn om stimulerend te werken op de groei van een adenocarcinoom. MOTTAL en MCCOY (1964) bevestigden deze waarneming en vonden dat de door de fibroblasten gevormde groeibevorderende factor niet soort-specifiek was. Blijkbaar wordt in deze cellen een stof geproduceerd, die door diffusie de kankercel bereikt en deze tot groei stimuleert. Aangezien de ontbrekende stof niet soort-specifiek is, bestaat de mogelijkheid dat het een laag-moleculaire stof is. Misschien werkt deze stof op een overeenkomstige wijze als de laagmoleculaire stoffen in het schema van JACOB en MONOD (blz. 5), waardoor het operon, dat betrokken is bij de celgroei, ontkoppeld wordt.

Door een weinig lucht in de subcutis te brengen kunnen verschillende pathologische processen bestudeerd worden. Zo onderzochten RINDANI en SELEYE (1953) de ontstekingsreactie. Het bleek, dat crotonolie vooral de vorming van fibroblasten tot gevolg had. In 1957 publiceerde SELEYE de resultaten van een onderzoek, waarbij hij Walker tumorcellen met en zonder crotonolie in dergelijke „air-pouches” bracht. Hij bemerkte dat de ontstekingsreactie, opgewekt met crotonolie, de tumorgroei bevorderde. Indien lokaal bijnierschorschormonen toegediend werden, bleek de tumorgroei bevorderende invloed van crotonolie geremd te zijn.

CRAMER en STOWELL (1942) bestudeerden de eerste stadia van de carcinogenese veroorzaakt door 20-methylcholanthreen op de huid van de muis. Zij schonken betrekkelijk weinig aandacht aan het stroma, in tegenstelling tot MALTONI en ZAJDELA (1963). De laatst genoemde onderzoekers namen een geleidelijke vervanging van het normale bindweefsel waar. De beschadiging van de bloedvaten beschouwden zij als de belangrijkste afwijking. Daarna verscheen oedeem, proliferatie van bindweefselcellen, toename van zure mucopolysacchariden en collageen. De ernst van de afwijkingen was te correleren met de potentie van het carcinogeen en de gevoeligheid van het proefdier. De auteurs kwamen tot de conclusie, dat het nieuw gevormde bindweefsel de voorwaarde schiep voor de infiltratieve groei van het erboven gelegen epitheel. Een steun voor deze opvatting was het feit, dat het bindweefsel rondom groeiende tumoren het karakter bleef behouden van het aanvankelijke aanwezige

onrijpe, losmazige bindweefsel. Het stroma van tumoren, die in regressie gingen, toonde evenwel fibrosering van het bindweefsel.

d. *Stoornissen van het immunologische apparaat*

Geleidelijk aan worden de mechanismen, die ten grondslag liggen aan locale evenwichtsprocessen ontsluit. Misschien staat dit locale gebeuren onder invloed van hogere regulatiemechanismen.

BURNET (1964) schonk vooral aandacht aan het immunologische apparaat, dat gedurende het kankerproces een rol zou kunnen spelen. Uitgaande van de „homograft” reactie kan gespeculeerd worden over de biologische betekenis, die men aan dit verschijnsel moet toekennen. Mogelijk ontstaan gedurende het leven gemuteerde cellen, die als lichaamsvreemd door immunologisch competente cellen herkend en geëlimineerd worden. Indien deze veronderstelling juist is, zijn er verschillende mogelijkheden, waardoor een bepaalde celsoort min of meer autonoom zou kunnen gaan woekeren. Ten eerste bestaat de mogelijkheid dat immunologisch competente cellen dusdanig beschadigd worden, dat ze niet meer in staat zijn „spontane mutanten” uit de weg te ruimen. Vervolgens kunnen mutanten zoveel antigenen verliezen dat ze niet meer herkenbaar zijn voor de immunologisch competente cellen. Tenslotte zou de groei van de bijzondere celsoort zo snel kunnen gaan, dat immunologisch competente cellen er geen vat meer op hebben.

De resultaten van enige onderzoeken illustreren het belang van het immunologische apparaat gedurende de carcinogenese. Als het immunologische apparaat voor een deel uitgeschakeld wordt door b.v. bij pasgeboren muizen thymectomie te verrichten ziet men meer huidtumoren na penseling van de huid met een carcinogeen (MILLER e.a. 1963). VANDEPUTTE e.a. (1963) namen een overeenkomstig effect waar als zij neonataal gethymectomeerde ratten het tumor veroorzakende polyoma virus toedienden. Ook bij hamsters en muizen blijkt thymectomie na de geboorte de groei van polyoma-geïnduceerde tumoren te versnellen (DEFENDI en ROOSA, 1965). Door de bij normale dieren aanwezige afweer zullen kankercellen, die een lichaamsvreemd antigeen bezitten, voor een deel geëlimineerd worden, zodat groei en uitzaaiing geremd wordt. Wanneer deze normaal aanwezige afweer verlaagd wordt, verschuift het evenwicht ten gunste van de tumorcellen. Indien het reticulo-endotheliale systeem

aspecifiek geprikkeld wordt met mycobacteriën blijkt de ontwikkeling van geënte maligne tumoren sterk geremd te worden (HALPERN, 1964).

BERENBAUM (1964) wijdde een kritisch artikel aan dit probleem.

C. BEGRIPPEN IN DE EXPERIMENTELE CANCEROLOGIE

Reeds in 1775 had Sir Percival Pott verband gelegd tussen het beroep van schoorsteenveger en de hoge frequentie van scrotumcarcinoom. Toch slaagden eerst in 1918 Yamagiva en Ischikawa erin dit verband experimenteel te bevestigen.

Uitgaande van dit experiment zijn talrijke onderzoeken verricht. DEELMAN (1924, 1927) nam een toename van de frequentie van huidtumoren waar als hij het gebied dat gepenseeld was mechanisch beschadigd had. Dit fenomeen staat bekend als het Deelman-effect. Het bleek, dat ook andere factoren dit effect konden veroorzaken. Oliezuur bleek deze eigenschap ook te bezitten (TWORT en TWORT, 1939).

ROUS en medewerkers (1941, 1944) beschreven het gedrag van tumoren, die ontstonden na herhaalde applicaties van teer op de huid van konijnen. Er ontwikkelden zich vrij snel papillomen, waarvan sommige reeds tijdens de behandeling in regressie gingen. Alle papillomen verdwenen echter na het staken van het teren. De groei was en bleef afhankelijk van de gepenseelde stof; het betreft hier dus *conditionele* tumoren. Werd regelmatig doorgepenseeld dan gingen slechts enkele papillomen op de duur over tot carcinoom. Tumoren, die in regressie gingen na het staken van de behandeling verschenen weer op dezelfde plaats als het teren hervat werd. Het bleek, dat ook stoffen, die op zichzelf geen kankerverwekkende eigenschappen bezitten zoals terpentijn en chloroform het laatste verschijnsel op konden wekken. Uit deze waarnemingen leidde Rous de begrippen *initiatie* en *promotie* af. Initierende stoffen veranderen normale cellen tot *latente* of *slapende tumorcellen*. Promotiebevorderende factoren scheppen een situatie, waarin latente tumorcellen gaan woekeren, zodat een zichtbare tumor ontstaat. Tijdens de carcinogenese zijn dus verschillende fasen te onderscheiden. Initiatie bleek een irreversibel proces te zijn in tegenstelling tot promotie. Er zijn wel talrijke factoren bekend geworden, die een in-

vloed kunnen uitoefenen op de promotie, maar geen die de initiatie wijzigen.

Het is hoogst waarschijnlijk, dat het aangrijpingspunt van een initierende stof in de cel gelegen is (vgl. blz. 12). Het is echter allerm minst duidelijk waar en hoe promotie-bevorderende resp. remmende stoffen hun werking uitoefenen. Hoewel invloed op de naburige weefsels niet uitgesloten was, werd het accent gelegd op de tumorcel.

BERENBLUM en SHUBIK (1947) bestudeerden het experimentele carcinoom van de huid van de muis. Het bleek, dat bij de muis later papillomen ontstonden dan bij het konijn. Enige van deze gezwellen gingen in regressie, andere bleven stationair en enkele gingen over in carcinomen (SHUBIK, 1950). Als het carcinogeen regelmatig toegediend werd, ontwikkelden zich vrijwel altijd bij iedere muis een of meer carcinomen. Hoe minder gepenseeld werd, des te minder tumoren ontstonden er. Het bleek evenwel, dat in enkele gevallen slechts één dosering voldoende was om een carcinoom te veroorzaken.

Als de hoeveelheid toegediend carcinogeen onder de optimale drempel ligt kan de werking versterkt worden door bepaalde stoffen. Deze substanties worden *co-carcinogenen* genoemd. BOUTWELL (1964) legde er de nadruk op dat een co-carcinogeen principieel verschilt van een promotie-bevorderende stof. Inherent aan het begrip tumorpromotie ligt besloten dat er sprake is van een specifieke stap in de reeks van gebeurtenissen, die tot carcinoom leiden. Een co-carcinogeen zou deze werking niet hebben.

Grote mogelijkheden om het kankerproces nader te bestuderen, werden geschapen toen de sterk werkende promotie-bevorderende stof, crotonolie, ontdekt werd (BERENBLUM, 1941; BERENBLUM en SHUBIK, 1947). Als men een carcinogeen op een bepaald ogenblik vervangt door crotonolie ontstaan in dezelfde tijd een even groot aantal tumoren dan wanneer men doorgepenseeld zou hebben met het carcinogeen (KLINE en RUSCH, 1944). De tumoren bleken ook van dezelfde aard te zijn. Het carcinogeen bepaalt hoé tumoren zich ontwikkelen, crotonolie bepaalt wannéér deze ontstaan. De periode, die gelegen is tussen de laatste penseling met het carcinogeen en de eerste behandeling met crotonolie om toch nog een carcinoom op te wekken kan vrij groot zijn (BERENBLUM en SHUBIK, 1947; BOUTWELL, 1964).

Het promotie-bevorderende effect is alleen cumulatief als de hoeveelheid crotonolie, die per keer gegeven wordt boven een bepaalde drempel ligt en het interval tussen de verschillende applicaties niet te lang is. Er is blijkbaar op een bepaald ogenblik een zekere hoeveelheid crotonolie beslist nodig wil er tumorgroei optreden (BOUTWELL, 1964). Mogelijk bestaat het promotie-bevorderende effect van crotonolie uit de vorming van een gunstig tumorbed. Hoewel in het algemeen gesteld wordt dat toediening van een promotie-bevorderende stof vóór het carcinogeen geen invloed heeft op de tumorgroei is dit niet in overeenstemming met de feiten. Er ontstaan namelijk wel iets meer tumoren onder genoemde omstandigheden (TANNENBAUM, 1964). Het is ook gebleken dat crotonolie naast de promotie-bevorderende eigenschappen een initierende werking kan ontplooiën (ROE, 1956; BOUTWELL e.a., 1957). In de praktijk is het niet mogelijk een scherpe grens te trekken tussen initiatie- en promotie-bevorderende agentia. In het algemeen blijkt een werkzame stof beide eigenschappen te bezitten, hoewel meestal één kenmerk min of meer sterk domineert. Voor het onderzoek van het kankerproces blijft het van groot belang beide begrippen te onderscheiden (BERENBLUM, 1964).

Hoewel men algemeen van mening is dat initiatie een proces is, dat zich in het epitheel afspeelt, verdedigde ORR (1958) de opvatting, dat de essentiële veranderingen plaats vinden in het stroma. De onderzoekingen die mede door zijn medewerkers verricht waren (BILLINGHAM e.a., 1951; MARCHANT en ORR, 1953) steunden deze opvatting. Muizen die gedurende 12 weken gepenseeld waren met methylcholanthren kregen allen na enige weken huidtumoren. Indien vóór deze periode het gepenseelde epitheel getransplanteerd werd bleek er zich geen tumor uit te ontwikkelen. Wanneer de epidermis van het gepenseelde huidgebied vervangen werd door een onbehandeld transplantaat ontstonden op de normale wijze tumoren. Het gemeenschappelijke weefsel van de gebieden, waaruit zich tumoren ontwikkelden was dus het onder het epitheel gelegen bindweefsel. Het lijkt waarschijnlijk dat tumorgroei en de uiteindelijke infiltratieve celwoekering van het epitheel geweten moet worden aan factoren samenhangend met de regulatiemechanismen die op de een of andere manier ook afhankelijk zijn van het onder het epitheel gelegen weefsel.

Belangrijke gegevens zijn verkregen na de bestudering van het

effect van enige factoren op de initiatie en de promotie van het kankerproces. Noch beperking van het aantal toegediende calorieën (BOUTWELL en RUSCH, 1957), noch toediening van verschillende chemische stoffen, waaronder cortison (BOUTWELL, 1964) bleek van invloed te zijn op het eerste stadium van de carcinogenese. Beperking van het aantal toegediende calorieën bleek echter, evenals cortison, de promotie te remmen. TRAININ (1963) toonde ook aan dat een deficiëntie van bijnierschors hormonen de tweede fase van het kankerproces bevordert. BERENBLUM (1964) vermeldde de promotie-remmende werking van mosterdgas, het 2,2-dichloordiethylsulfide.

Het blijkt dus, dat initiatie een onbeïnvloedbaar proces is, terwijl de gebeurtenissen die zich later afspelen en tot gezwelvorming kunnen leiden zowel in positieve als negatieve richting omgebogen kunnen worden.

Hoewel het reeds meerdere onderzoekers opgevallen was dat een tumor tijdens zijn bestaan kwaadaardiger leek te kunnen worden, is het FOULDS (1949, 1954) geweest, die dit verschijnsel nader analyseerde. Het begrip *progressie* werd door hem ingevoerd. Hieronder wordt verstaan, dat een of meer eigenschappen van een tumor dusdanig veranderen, dat de maligniteit toeneemt. Tot deze eigenschappen worden o.a. gerekend de groeisnelheid, het infiltratieve vermogen, het vermogen om te metastaseren, de gevoeligheid voor hormonen en het histologische beeld. FOULDS (1964) stelt dat het begrip *progressie* betrekking heeft op histologisch waarneembare tumoren. VAN NIE e.a. (1963) geven een meer uitgebreide betekenis aan het besproken begrip. Zij verstaan onder *progressie* alle veranderingen in de geschiedenis van gezwelsellen en hun afstammelingen, die verder van het normale weefsel afvoeren. FOULDS (1949) stelde enige algemene regels op, die op *progressie* betrekking hebben. Ten eerste stelde hij vast, dat *progressie* zich onafhankelijk in diverse aanwezige tumoren kan ontwikkelen. Dit verschijnsel is zowel in de experimentele als klinische pathologie bekend. In het algemeen ontwikkelt zich slechts een enkel carcinoom uit de poliepen bij de familiale intestinale polyposis. *Progressie* van verschillende eigenschappen kan in onderlinge onafhankelijkheid voorkomen. HAMPERL (1957) illustreert dit verschijnsel aan de wat hij noemt lokale maligne tumoren, die sterk infiltratief groeien doch zeer zelden aanleiding geven tot vorming van metastasen in tegenstelling tot de lokale

benigne tumoren, die slechts geringe infiltratie tonen, maar uitgebreid metastaseren. Voorts blijkt progressie niet afhankelijk te zijn van de groei van een gezwel. De verandering der eigenschappen kan zich zowel geleidelijk als sprongsgewijs voltrekken. De progressie kan langs verschillende wegen verlopen, waarbij het eindproduct al dan niet gelijksoortig is. Het is namelijk mogelijk, dat een tumor enige trappen in zijn ontwikkeling overslaat. Tumoren, die eerst afhankelijk waren van de aanwezigheid van hormonen, kunnen deze eigenschappen later verliezen. Daarnaast bleken tumoren met hetzelfde histologische beeld vanaf de eerste ontwikkeling in het geheel niet op hormonen te reageren en er dus onafhankelijk van te zijn. De progressie bereikt tijdens de levensduur van het tumordragend organisme lang niet altijd het eindpunt.

Met behulp van literatuurgegevens wordt aan de hand van fig. 5 een denkbeeldig tumorproces beschreven. Normaal bestaat in het

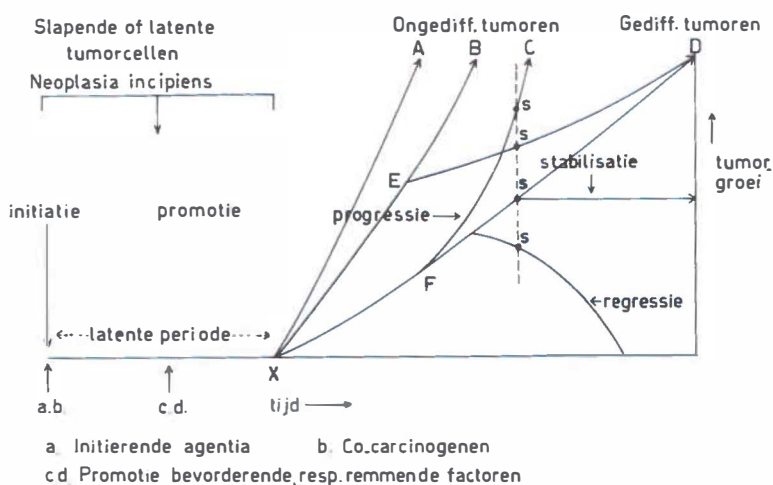


Fig. 5
Begrippen uit de experimentele cancerologie.

lichaam een natuurlijk evenwicht tussen aan- en afbraak van cellen. Afbraak vindt dikwijls via een gedifferentieerde fase van de cel plaats. In de huid wordt één van iedere 2 nieuw gevormde cellen via een keratine-vormende cel afgestoten. Bestaat het produkt van een deling echter uit twee ongedifferentieerde cellen dan is het resultaat

in de eerste plaats een toename van het aantal basale cellen en in de tweede plaats wordt geen gedifferentieerde cel gevormd, zodat geen remmende substantie geproduceerd wordt. Het aantal celdelingen zal dus in het stratum basale toenemen (vgl. fig. 2). De duur van een mitose en de periode gelegen tussen twee celdelingen, behoeven niet veranderd te zijn. De toename van cellen kan uiteindelijk het gevolg zijn van contact van een carcinogene stof met het desbetreffende weefsel. Het proces, dat plaats vindt tijdens het contact in het weefsel noemt men *initiatie*. Dit is waarschijnlijk een kortstondig, irreversibel gebeuren. Er bestaan geen doses van het carcinogeen, die beneden een drempelwaarde liggen (MÜHLBOCK, 1959). De werking van de carcinogenen kan versterkt worden door de zgn. *co-carcinogenen*. De tijd, die gelegen is tussen initiatie en het punt X, waarop de tumorgroei begint heet de *latente periode*. Gedurende de tweede fase van de carcinogenese, de *promotie*, blijken de regulatiemechanismen nog in staat te zijn het normale evenwicht te handhaven. In het betrokken weefsel moeten zich echter belangrijke afwijkingen voltrokken hebben. De veranderde cellen worden wel *slapende* of *latente tumorcellen* genoemd. Met deze naam legt men het accent te sterk op de toekomstige kankercellen, terwijl de rest van het organisme met zijn regulatie-mechanismen buiten beschouwing blijft. *Neoplasia incipiens* (FOULDS, 1964) is een algemene uitdrukking, waarin uitkomt dat het betrokken weefsel de potentie heeft tot gezwelvorming. Deze fase van het kankerproces bleek zowel in positieve als in negatieve zin beïnvloed te kunnen worden. Waar en hoe de promotie-bevorderende, resp. remmende factoren hun werking uitoefenen is nog een onopgelost vraagstuk. Er zijn aanwijzingen dat de promotie-bevorderende werking van crotonolie plaats vindt via het tumorbed (SELEYE, 1957).

Het is mogelijk, dat er zich slechts een geringe verschuiving voltrekt tussen de prolifererende en gedifferentieerde cellen. Het aantal cellen neemt echter wel onherroepelijk toe, hoewel een groot deel zal differentieren en te gronde gaan. De wijze van groei wordt in het schema voorgesteld door de lijn XD. Vanaf het prille begin kan de verschuiving zo uitgesproken zijn, dat er praktisch geen differentiatie meer optreedt. De tumor groeit nu snel en bestaat voornamelijk uit ongedifferentieerde cellen (XA). Afhankelijk van de grootte van de verschuiving zijn er allerlei variaties mogelijk tussen de typen XD

en XA. Als tijdens de groei van een tumor zich een nieuwe verschuiving voordoet tussen de prolifererende en differentierende cellen kan de snelheid van de tumorgroei en de differentiatie op verschillende manieren gewijzigd worden. Ligt het accent op de proliferatie dan is *progressie* ontstaan (FC). Een aanvankelijk gedifferentieerde tumor kan anaplastisch worden. Neemt de differentiatie ten gunste van de proliferatie toe dan ontwikkelt zich uit een ongedifferentieerde tumor een gedifferentieerd gezwel (ED). Wordt het oude evenwicht tussen de aan- en afbraak van cellen hersteld dan spreekt men van *stabilisatie*. Het is theoretisch voorstelbaar, dat dit verschijnsel in ieder type tumor voor kan komen. Als voorbeeld zijn in het schema enige mogelijkheden met S aangegeven. Voorts is het mogelijk, dat op ieder moment de afbraak gaat heersen over de aanmaak. De tumor gaat dan in *regressie*.

Gedurende de ontwikkeling van een tumor kunnen de verschillende processen zich alle afspelen. Talloze variaties zijn denkbaar. Iedere verschuiving betekent dat een nieuw evenwicht ontstaan is, dat op zijn beurt bepaald wordt door de tumorcel en de rest van het organisme. Het is goed voorstelbaar, dat geen twee tumoren gelijk zijn. Verschillende delen van één tumor kunnen waarschijnlijk onafhankelijk van elkaar onderhevig zijn aan de verschillende beschreven processen. Dit verklaart het histologische beeld van sommige tumoren, die opgebouwd zijn uit zowel gedifferentieerde als anaplastische gebieden.

Naast de beschreven veranderingen in groei kunnen ook andere eigenschappen tijdens de tumorgroei zich wijzigen. De verschijningsvorm van iedere tumor is uniek en weerspiegelt op ieder moment de ernst van de evenwichtsstoornis, die bestaat tussen het organisme en het gezwel.

Hoofdstuk II

LITERATUUROVERZICHT VAN HET EXPERIMENTELE CERVICO-VAGINALE CARCINOOM

INLEIDING

In het dierenrijk komt het cervixcarcinoom zelden spontaan voor (COTCHIN, 1964). STERNBERG (1961) vond een intra-epitheliaal cervixcarcinoom bij een *Macaca mulatta*. Bij dezelfde soort aap beschreven HISAW en HISAW (1958) een infiltrerend carcinoom met metastasen. Ook bij koeien (SMITH en JONES, 1957) en paarden (HAYGARD, 1955) is het cervixcarcinoom een enkele keer waargenomen. PETIT (1908) diagnostiseerde de tumor bij een gazel. Bij een kat toonde BOUCEK (1906) een plaveiselcelcarcinoom met veel reuscellen aan. BETHKE (1911) vermeldde een adenocarcinoom van de cervix bij een veertig jaar oude rhinoceros. GARDNER en PAN (1948) beschreven een muizenstam (PM), waarin het cervixcarcinoom in een vrij hoog percentage spontaan voorkwam. Deze stam is uitgestorven.

Het meest gebruikte proefdier, waarbij het cervico-vaginale carcinoom experimenteel opgewekt wordt is de muis. De gevoeligheid voor carcinogenen verschilt van stam tot stam (SCARPELLI en VON HAAM, 1960; THIERY, 1962). De C₃H-stam bleek geschikt te zijn voor het experimentele onderzoek.

A. ANATOMIE EN FYSIOLOGIE VAN HET CERVICO-VAGINALE GEBIED VAN DE MUIS

Anatomie (vgl. fig. 6). De vagina van de muis gaat zonder bescherming van weefsels, die homoloog zijn met de labia minora over op de vulva. De bekleding bestaat uit meerlagig plaveiselcelepitheel zonder klieren. Door de vrij grote clitoris loopt de urethra. De cervix splitst op 1 tot 3 mm vanaf het ostium uteri externum. Het lumen van de cervix blijkt ook bekleed te zijn met plaveiselcelepitheel, dat

Schematisch overzicht van de uterus bicornis unicollis muris

Frontale doorsnede

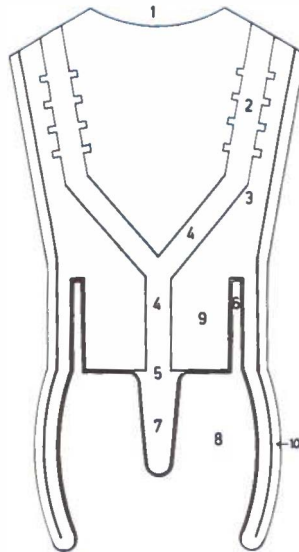


Fig. 6

1 = fundus uteri; 2 = cavum uteri; 3 = isthmus uteri; 4 = canalis cervicis; 5 = ostium uteri; 6 = fornix vaginae; 7 = plica cervico-vaginalis; 8 = vagina; 9 = portio uteri; 10 = tunica muscularis vaginae.

evenwel dunner is dan het vaginaepitheel. De overgang naar het cubisch-cylindrische epitheel van de cornua uteri is vrij scherp. Het bindweefsellaagje onder het epitheel is te onderscheiden van de rest van het stroma als submucosa. De buitenste longitudinale spierlaag van het myometrium loopt geleidelijk over in de tunica muscularis vaginae. Het microscopische beeld van de vagina en de cervix is niet constant, maar ondergaat cyclische veranderingen gedurende de reproductieve fase, waarbij het epitheel van de vagina de meest uitgesproken veranderingen toont. ALLEN bestudeerde in 1922 deze verschijnselen bij de muis, hetgeen STOCKARD en PAPANICOLAOU reeds eerder in 1917 bij de cavia gedaan hadden.

Fysiologie. Het volledig ontwikkelde epitheel bestaat uit het stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum en stratum corneum. Het is gebleken, dat de hoogte van het epitheel en de dif-

ferentieatie der cellen afhankelijk zijn van de spiegel der geslachts-hormonen. Zo atrofieert na ovariectomie het epitheel, waarbij slechts 2 tot 3 cellagen overblijven. Enige oppervlakkig gelegen cellen blijken dan slijm te produceren. Ongeveer 10 uur na een injectie met oestrogenen vormen de basale cellen DNZ (PERROTTA, 1962) waarna ze delen. De laatstgenoemde auteur constateerde na ongeveer 15 uur een hernieuwde celdeling van een deel der pasgevormde cellen.

Door oestrogenen wordt niet alleen de celdelingsactiviteit bepaald, maar ook de aard van de differentiatie. ROSA en VELARDO (1959) toonden bij ratten aan, dat een lage dosis oestrogenen slijmproductie tot gevolg had en een hoge dosis hoornvorming. Na een voldoende dosis oestrogenen wordt een deel der pasgevormde cellen reeds in de basale cellaag tot hoornvormende cellen; binnen 48 tot 72 uur heeft zich een meerlagig verhoornend plaveiselepitheel gevormd (BIGGERS, 1953). Evenals in alle weefsels bestaat in het cervico-vaginale epitheel een evenwicht tussen de celaanmaak en celfbraak. Het aantal cellen in de basale cellaag blijft constant. Na iedere celdeling moet er één verdwijnen. De gegevens wijzen erop, dat de betreffende cel verdwijnt na gedifferentieerd te zijn geweest. De differentiatie bestaat uit slijm- of hoornvorming. Mogelijk is de aard van de differentiatie gekoppeld aan de celdelingsactiviteit. Dit is af te leiden uit de experimenten van ROSA en VELARDO (1959). Indien de celdelingsactiviteit hoog is verdwijnt de helft van de nieuwgevormde cellen na hoorn geproduceerd te hebben. Als het aantal celdelingen laag is, verdwijnt de helft van de gevormde cellen na slijm gevormd te hebben. De levensduur van een slijmvormende cel is waarschijnlijk langer dan van een hoornvormende cel. De celdelingsactiviteit manifesteert zich histologisch dus niet alleen aan het aantal celdelingsfiguren maar ook binnen zekere grenzen aan de aard van de differentiatie van het epitheel.

Gedurende de cyclus van de muis, die ongeveer 4 à 5 dagen duurt worden zowel ongedifferentieerde als slijm- en hoornvormende cellen gevormd. De cyclus is te verdelen in verschillende stadia (ALLEN, 1922). Men spreekt van dioestrus als de vorige oestrusperiode geheel is afgelopen en de volgende nog niet is begonnen. Vóór het hoogtepunt van iedere cyclus, de oestrus, gaat een bepaald stadium vooraf, dat pro-oestrus genoemd wordt. Tussen de oestrus en de dioestrus is de metoestrus gelegen. WALKER (1960) toonde bij de muis aan dat

cellen, die laat in de pro-oestrus aangemaakt worden het bekleedende epitheel vormen van de vagina tijdens de dioestrus. Gedurende de eerstvolgende cyclus worden de oppervlakkige cellen van het epitheel tijdens de dioestrus opgeduwd door de nieuwe generatie cellen. Ze behouden hun kernen en produceren slijm. Zoals blijkt wordt een deel van de nieuwgevormde cellen tot hoornvormende cellen. Gedurende de pro-oestrus vindt men dan ook aan het oppervlak slijmvormende cellen en tijdens de oestrus hoornmateriaal. Hoewel de betekenis van progesteron tijdens de normale cyclus niet geheel duidelijk is weet men, dat gedurende de pseudo- en de normale zwangerschap dit hormoon van groot belang is (LAMMES, 1963).

Het is nog een onopgelost vraagstuk waar in de cel het primaire aangrijpingspunt der geslachtshormonen gelegen is. Wel is bekend, dat oestrogenen RNZ- en eiwitsynthese tot gevolg hebben (MUELLER e.a., 1961; UI en MUELLER, 1963). Zoals in hoofdstuk I (fig. 1) besproken werd volgt eiwitsynthese op een signaal uit de kern. Vanuit theoretisch oogpunt kan het DNZ in de kern direct gestimuleerd worden tot vorming van boodschapper RNZ, dat de eiwitsynthese in het cytoplasma induceert. De oestrogenen kunnen dus zeer wel hun aangrijpingspunt vinden in het DNZ. Deze voorstelling van zaken wordt gesteund door de onderzoeken van CLEVER en KARLSON (1960) en KARLSON (1963). Gedurende de metamorfose vindt in de reuzenchromosomen van het insect *Chironomus tentarus* een voorbijgaande vorming plaats van ogenschijnlijke verdichtingen - puff's. Deze verandering staat onder invloed van het metamorfose hormoon, ecdyson, waarschijnlijk een steroid. Binnen 2 uur kan dit hormoon nieuwe puff's doen ontstaan, terwijl tegelijkertijd andere, reeds bestaande, verdwijnen. Waarschijnlijk wordt op deze plaatsen boodschapper RNZ gevormd, dat in het cytoplasma eiwitsynthese tot gevolg heeft. Het is evenwel mogelijk, dat deze veranderingen van het DNZ een gevolg zijn van een ontkoppeling van het operon, waarvan ze deel uitmaken. De bijpassende repressor zou namelijk in het cytoplasma allosterisch geremd kunnen worden door oestrogene hormonen (MONOD e.a., 1963). Gekoppeld aan de repressor kan het hormoon in de kern verschijnen. Al kan men met behulp van de autoradiografie het hormoon op zijn weg vervolgen (ATTRAMADAL, 1964) toch blijft het zeer moeilijk om het complexe gebeuren te ontwarren.

Opvallend is dat het hormoon zijn groeibevorderend effect bewerkstelligt zonder dat de moleculaire structuur gewijzigd wordt (JENSEN en JACOBSON, 1962).

Oestrogenen hebben niet alleen een verhoogde eiwitproductie tot gevolg, maar beïnvloeden waarschijnlijk ook bestaande enzym-systemen. Men heeft namelijk een kristallijn verkregen enzymstelsel, een transhydrogenase, kunnen stimuleren met oestrogenen (TALALAY en WILLIAMS, 1958; VILLEE, 1959).

Het is duidelijk dat de intra- en mogelijk de intercellulaire regulatiemechanismen van het cervico-vaginale epitheel in tegenstelling tot de huid sterk beïnvloed worden door de geslachtshormonen. Het is dus zeker niet geoorloofd de regulatiemechanismen van beide orgaansystemen te vereenzelvigen. Zowel JENSEN (1962) als BULLOUGH en RYTÖMAA (1965) veronderstellen de mogelijkheid, dat weefsels, die voor wat betreft hun vorm en functie afhankelijk zijn van hormonen, een groei-belemmerende factor bezitten, die door een bepaald hormoon geïnactiveerd zou kunnen worden.

De kennis over de invloed van geslachtshormonen op bindweefsel is summier en fragmentarisch. IVERSEN (1962) beschreef een daling van het aantal mestcellen in het bindweefsel van uterus en vagina bij de cavia na oestrogenen. JOHANSSON en WESTIN (1959) hadden dit verschijnsel ook bij de muis waargenomen; in de huid trad dit effect echter niet op.

Langdurige toediening van oestrogenen wordt gevolgd door een stijging van het aantal mestcellen bij de hamster (KELLSALL en CRABB, 1959) en bij de cavia (IVERSEN, 1962). Ook het aantal eosinofiele leucocyten neemt onder invloed van oestrogenen bij de muis toe (BJERSING en BORGLIN, 1964). Oestrogenen kunnen bovendien de verhouding hyaluronzuur en chondroitinesulfaat in de cervix uteri van de vrouw wijzigen (IVERSEN en MARCKER, 1961). PRIEST en KOPLITZ (1962) zagen na toediening van oestrogenen een daling van de zure mucopolysacchariden in de aorta en het ribkraakbeen. KVARSTEIN e.a. (1963) namen een overeenkomstig effect waar op het chondroitinesulfaat B-gehalte van de huid van de rat na een zeer hoge dosis oestradiol. Oedeem van het stroma wordt door meerdere auteurs vermeld. Het is wel duidelijk dat oestrogenen een bepaalde invloed kunnen uitoefenen op bindweefsel. Een gecombineerd morfologisch, histo- en biochemisch onderzoek onder gestandariseerde

omstandigheden zal in de toekomst exactere resultaten kunnen verschaffen.

B. HET CHEMISCH GEINDUCEERDE CERVICO-VAGINALE CARCINOOM

a. *Tumorveroorzakende agentia*

Hoewel het aanvankelijk niet gelukte bij de muis cervixcarcinomen op te wekken slaagden later meerdere onderzoekers erin bij een groot aantal van de proefdieren carcinoom te veroorzaken. GARDNER e.a. (1938) en ALLEN en GARDNER (1941) wekten cervixcarcinoom op door gedurende een lange periode oestrogenen toe te dienen; één tumor metastaseerde zelfs. CROSSEN en LOEB (1944) vonden, dat bij oudere dieren eerder carcinoom ontstond na oestrogenen dan bij jonge muizen. Indien gedurende de behandeling cholesterol in de vagina gebracht werd verschenen in korte tijd tumoren (GARDNER, 1959). Werden oestrogenen in plaats van subcutaan intravaginaal toegediend dan ontwikkelden zich sneller tumoren (GARDNER, 1959; WILLIAMS, 1953). Dit verschijnsel werd door DONTENWILL e.a. (1963) ook bij hamsters aangetoond. Het blijkt dus dat oestrogenen bij de muis o.a. cervixcarcinomen kunnen veroorzaken.

Hormonen met kankerverwekkende eigenschappen zijn alle groei-stimulerende hormonen. Het carcinogene effect van een hormoon is altijd afhankelijk van een meer dan normaal effect van het betreffende hormoon op zijn eindorgaan (MÜHLBOCK, 1959, 1963). Laatstgenoemde auteur onderzocht het verband tussen mammacarcinoom bij de muis en oestrogenen. De tumorfrequentie van het mammacarcinoom is afhankelijk van de hoeveelheid toegediende oestrogenen. Indien de hormonen continu gegeven werden bleken duidelijk meer tumoren te verschijnen dan wanneer de toediening intermitterend plaats vond. De conclusie van deze laatste waarneming was dat het mechanisme van de hormonale carcinogenese anders is dan dat van de chemische carcinogenese.

Talrijke onderzoekers bestudeerden de chemische carcinogenese, waarbij gebruik gemaakt werd van twee principieel verschillende technieken. Ten eerste is het mogelijk een draad, waarin carcinogene stoffen opgenomen zijn in de cervix te brengen. Dit is de zgn. draad-techniek, die o.a. door MURPHY (1953) toegepast werd. IJAMA e.a. (1964) zagen reeds na 5 weken infiltrerende carcinomen. Het me-

chanische trauma, dat inhaerent aan deze methode is, bevordert de carcinogenese (LI MIN-HSIN e.a., 1962). Voorts is het mogelijk het carcinogeen direct of via een speculum in de vagina te brengen. Het voordeel van deze methodiek is, dat het carcinogeen tamelijk nauwkeurig gericht op de bedoelde plaats gebracht wordt zonder dat tegelijkertijd een mechanisch trauma veroorzaakt wordt. Ook kan het carcinogeen fijner gedoseerd worden (VAN WEERING, 1933; MURPHY, 1953; THIERY, 1962). Nadat aanvankelijk de vagina en de cervix gepenseeld waren met ruwe teerpreparaten, ging men later over tot de gezuiverde carcinogene stoffen. Ruwe preparaten, waarmee de laatste jaren nog geëxperimenteerd is, zijn ruwe tabaksteer (BOGAEZ en KOPROWSKA, 1961; CHU e.a., 1962), menselijk smegma (PRATT-THOMAS e.a., 1956, HEINS e.a., 1958) en spermiciden (HOCH-LIGATI, 1957). Deze onderzoekers verwekten met al deze stoffen cervixcarcinoom. GOVINDA en BARWAB (1963) slaagden er niet in met menselijk smegma carcinomen te veroorzaken. Wel vonden ze bij drie van de 16 muizen een opmerkelijke hyperplasie van het epitheel.

Bekende aangewende carcinogenen zijn 3,4-benzopyreen (VON HAAM en SCARPELLI, 1955; KOPROWSKA e.a., 1958; THIERY, 1962), methylcholanthreen (MURPHY, 1953; IJIMA e.a., 1964) en dimethylbenzanthraceen (MEISELS, 1964). Podophylline bleek een zeer zwakke carcinogene werking te hebben (KAMINETZKY en MCGREW, 1962). Niet specifieke chemische stoffen kunnen ook carcinomen verwekken (BOYLAND, 1961). Ook zijn combinaties van verschillende agentia toegepast. GARDNER (1959) nam een groot aantal cervico-vaginale carcinomen waar nadat hij tegelijkertijd ureum, adipinezuur en carboxymethylcellulose in de vagina gebracht had. LI MIN-HSIN e.a. (1962) induceerden carcinomen door een gecombineerde behandeling, die bestond uit trauma, locale mechanische irritatie en crotonolie.

De invloed van hormonen op het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom is op meerdere manieren onderzocht. Alvorens de literatuurgegevens, die hierop betrekking hebben te bespreken zal eerst nagegaan worden wat bekend is over het effect dat ovariectomie op de carcinogenese heeft. Om de overzichtelijkheid te bevorderen worden achter de namen van de onderzoekers de techniek, het gebruikte carcinogeen en het proefdier vermeld.

KRIEG en REAGAN (1961, dr.t. = draadtechniek, 20-methylcholanthreen, C₃H-muizen) vonden dat ovariectomie de latente periode verkortte. Het grootste verschil met de controlegroep werd 2 tot 4 weken na toediening van het carcinogeen waargenomen. Na ongeveer 6 weken was het verschil sterk gereduceerd. GLÜCKSMANN en CHERRY (1962, p.t. = penseeltechniek, 9,10-dimethyl-1,2-dibenzanthreen, C₃H- en Strong A-muizen) zagen dat ovariectomie geen effect had op de frequentie van het aantal tumoren van de cervix. Wel bleek de mucoepidermoïde variëteit van het plaveiselcelcarcinoom duidelijk meer voor te komen. LI MIN-HSIN e.a. (1962, dr. t., methylcholanthreen, KM-muizen) vermeldde veel meer carcinomen bij intacte dan bij geovariectomeerde dieren. LAFFARGUE e.a. (1963, dr.t., methylcholanthreen, C₃H-muizen) troffen in de geovariectomeerde muizen meer tumoren aan dan in de controlegroep, die tegelijkertijd opgeofferd werd. Waarschijnlijk verkortte dus de ovariectomie de latente periode.

De experimenten van KRIEG en REAGAN zijn vergelijkbaar met die van LAFFARGUE e.a. Hun resultaten stemmen met elkaar overeen. De gevonden verkorte latente periode is niet in tegenspraak met de waarneming van GLÜCKSMANN en CHERRY. Een van de mogelijkheden waarom bij geovariectomeerde dieren eerder carcinoom optreedt is dat het carcinogeen door het lage epitheel meer basale cellen bereikt in een hogere concentratie dan bij intacte dieren. Deze opvatting vindt enige steun in het resultaat van een onderzoek van STEIN-WERBLOWSKY (1960). Twee van de 53 ratten, die tijdens de dioestrus gepenseeld werden, ontwikkelden een cervixcarcinoom, terwijl in de groep, die tijdens de oestrus gepenseeld was, geen tumoren voorkwamen. De waarneming van LI MIN-HSIN en medewerkers past echter niet in deze gedachtengang.

b. *Hormonale beïnvloeding van de carcinogenese*

Invloed van oestrogenen op het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom bij niet geovariectomeerde proefdieren.

KLAVINS en KAUFMAN (1962, dr.t., 20-methylcholanthreen, C₃H-muizen) begonnen een week vóór het inbrengen van de draad met de toediening van 50 µg oestradiolbenzooat. Daarna werd dezelfde

hoeveelheid hormonen eenmaal per week ingespoten. De onderzoekers vonden geen verschil in de frequentie der tumoren tussen de groep, die met oestrogenen behandeld was en de controlegroep. Wel waren de tumoren in de eerste groep meer gedifferentieerd. LI MIN-HSIN e.a. (1962, dr.t., methylcholanthreen KM-muizen) kwamen tot dezelfde conclusie. Zij doseerden het hormoon lager, nl. 15 μ g per week. MEISELS (1964, dr.t., dimethylbenzanthraceen, CF-muizen) gaf de muizen eenmaal per week 1 μ g α -oestradiol. Het resultaat was dat de latente periode verlengd werd nl. van 91,8 naar 144,2 dagen. Bij het konijn zagen ALVIZOURI en RAMIRÉZ DE PITA (1964, dr.t., methylcholanthreen) geen effect van oestrogenen op de cervixtumoren, die na ongeveer een jaar verschenen. KLINE (1963) ging bij ratten de invloed van oestrogenen na op de atypische veranderingen van het vaginaslijmvlies, die door podophilline, een alkaloid, opgewekt waren. Een verandering werd niet vastgesteld. KOPROWSKI (1964, p.t., tabaksteer, 3,4-benzopyreen, C₃H- en Zbc-muizen) toonde aan dat stilboestrol waarschijnlijk een tumorbevorderende werking heeft bij C₃H-muizen, die gedurende 74 weken met tabaksteer gepenseeld waren. Oestradiolvaleraat bleek de latente periode van het met 3,4-benzopyreen opgewekte cervico-vaginale carcinoom te bekorten. Ook moet het onderzoek van PERRY (1939) genoemd worden, die door de huid van de muis te penselen met 1,2,5,6-dibenzanthraceen en tegelijkertijd oestrogenen te injiceren cervixcarcinomen kon induceren.

Er zijn dus resultaten, die tonen dat oestrogenen onder genoemde omstandigheden bij muizen van de C₃H- en KM-stam de carcinogenese niet bevorderen, terwijl de differentiatiegraad van de tumoren wel toeneemt. MEISELS, die lager doseerde en een andere muizenstam en ook een ander carcinogeen gebruikte vond evenwel een remmend effect in tegenstelling tot KOPROWSKI, die een bevorderende invloed waarnam.

Invloed van oestrogenen op het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom bij geovariectomeerde dieren.

VON HAAM en ALBERTY (1960) gaven 1000 m.e. oestrogenen aan 25 geovariectomeerde muizen, die verder behandeld werden met 20-methylcholanthreen. Een controlegroep van eveneens 25 muizen

werd alleen behandeld met 20-methylcholanthreen. Ze vonden in de met hormonen behandelde groep 17 en in de controlegroep 7 carcinomen. De conclusie was dat oestrogenen als co-carcinogeen gewerkt hadden. MURPHY (1961, dr.t., methylcholanthreen, A/Sn-, C₃HeB/FeJ- en 129/J-muizen) bracht 4 weken na het carcinogeen een mengsel van dimethylstilboestrol en cholesterol intravaginaal in. Onder invloed van dit preparaat steeg het aantal carcinomen van 13,2 tot 90,2 % terwijl de latente periode verkort werd. Indien de concentratie van het oestrogene hormoon verlaagd werd daalde ook het aantal carcinomen. Het oestrogeen zou hier een promotie-bevorderende factor geweest zijn. Er werd geen invloed van oestrogenen op de tumorfrequentie waargenomen als het carcinogeen langdurig toegediend werd. LI MIN-HSIN e.a. (1962, dr.t. methylcholanthreen, KM-muizen) concludeerden uit hun experimenten, dat een wekelijkse dosering van 15 µg oestradiolbenzooat de ontwikkeling van het cervixcarcinoom bevorderde. LAFFARGUE e.a. (1963, dr.t., methylcholanthreen, C₃H-muizen) vonden echter dat oestrogenen niet de frequentie van het aantal tumoren beïnvloedden, maar het infiltratieve vermogen der tumoren remden. KAMINETZKY en SWERDLOW (1964, p.t., podophylline, C₃H-muizen) bemerkten, dat alleen de dieren behandeld met oestrogenen nl. tweemaal per week 0,1 mg oestradiolbenzooat, afwijkingen toonden, die suggestief waren voor infiltratieve groei.

Hoewel de verschillende verrichte experimenten niet geheel vergelijkbaar zijn kan in het algemeen geconcludeerd worden, dat ovariectomie gevolgd door toediening van oestrogenen de carcinogenese bevordert. De waarneming van LAFFARGUE en medewerkers is echter hiermee in tegenspraak.

Invloed van progestogenen op het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom bij niet geovariectomeerde dieren.

LI MIN-HSIN e.a. (1962, dr.t., methylcholanthreen, KM-muizen) gaven 2 weken vóór het inbrengen van de draad viermaal 1 mg progesteron. Ook werd de invloed nagegaan op de carcinogenese, als het hormoon na het inbrengen van de draad gegeven werd. De conclusie uit de resultaten was, dat het hormoon enigszins remmend werkte. Deze bevinding werd door ALVIZOURI en RAMIRÉZ DE PITA (1962, dr.t., methylcholanthreen) bij het konijn niet bevestigd.

Invloed van progestogenen op het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom bij geovariectomeerde dieren.

GLÜCKSMAN en CHERRY (1962, p.t., 9,10-dimethyl-1,2-benzanthraceen, C₃H- en Strong A-muizen) vonden dat de muco-epidermoïde variëteit van het plaveiselcelcarcinoom in de geovariectomeerde groep muizen, die al dan niet met progesteron behandeld was, meer voorkwam dan bij de muizen behandeld met stilboestrol of thyroxine. Progesteron werkt enigszins remmend op de door podophylline veroorzaakte epitheelafwijkingen (KAMINETZKY en SWERDLOW, 1964, p.t., C₃H-muizen).

De resultaten van genoemde onderzoekers zijn te vaag om een bepaalde conclusie te kunnen trekken. De indruk bestaat, dat progesteron enigszins remmend kan werken op de carcinogenese.

Invloed van androgenen op het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom bij niet geovariectomeerde muizen.

SCARPELLI en VON HAAM (1960) konden bij muizen, die met androgenen behandeld werden, geen cervixcarcinoom opwekken, ondanks een voortgezette behandeling met 20-methylcholanthreen. WOLFSON (1963, p.t., 9,10-dimethyl-1,2-benzanthraceen) constateerde, dat testosteronpropionaat de ontwikkeling van het kankerproces vertraagde, indien het hormoon tegelijkertijd met het carcinogeen gegeven werd. MEISELS (1964, dr.t., dimethylbenzanthraceen, CF-muizen) bevestigde deze waarneming, hoewel het verschil met de controlegroep niet groot was. KLINE (1963) nam geen invloed waar van androgenen op de door podophylline veroorzaakte epitheelveranderingen van de vagina van de rat. Androgenen kunnen dus waarschijnlijk de carcinogenese remmen.

Invloed van combinaties van hormonen op het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom bij niet geovariectomeerde muizen.

PAN en GARDNER (1948) vonden door het geven van testosteronpropionaat aan de muis geen duidelijke daling van de frequentie van het cervico-vaginale carcinoom, dat veroorzaakt was met

oestrogenen. LI MIN-HSIN e.a. (1962, dr.t., methylcholanthreen, KM-muizen) dienden voor het inbrengen van de draad 15 μ g oestrogenen toe, daarna om de drie dagen 2,5 mg testosteronpropionaat, vervolgens gedurende 5 weken 15 μ g oestradiolbenzooat en 5 mg testosteron. De behandeling werd voortgezet met een combinatie van oestradiolbenzooat en testosteronpropionaat. De onderzoekers zagen geen verschil met de controlegroep.

Invloed van combinaties van hormonen op het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom bij geovariectomeerde muizen.

LI MIN-HSIN e.a. (1962, dr.t., methylcholanthreen, KM-muizen) vonden dat testosteron de aangetoonde bevorderende invloed van oestrogenen op de carcinogenese remde. KAMINETZSKY en SWERDLOW (1964, p.t., podophylline, C₃H-muizen) kregen de indruk dat progesteron remmend werkte op de afwijkingen veroorzaakt door podophylline en oestrogenen.

De invloed van de hypofysaire, evt. gonadotrope hormonen op het chemisch verwekte cervixcarcinoom is nog nauwelijks onderzocht. LI MIN-HSIN en medewerkers (1962) vonden een bevorderende invloed vooral op het begin van de carcinogenese door een gecombineerde behandeling van menselijke choriogonadotropinen en oestrogenen. Het onderzoek wordt bemoeilijkt omdat waarschijnlijk vrij snel antilichamen tegen gonadotrope hormonen geproduceerd worden.

c. *Microscopisch waarneembare veranderingen*

In het begin van het zich ontwikkelende kankerproces vindt men in geprononceerde vorm het histologische beeld van het slijmvlies, dat normaal is voor de metoestrus (SCARPELLI en VON HAAM, 1960). In het plaveiselcelepitheel zijn talrijke polynucleaire leucocyten, die soms in groepjes bij elkaar liggen. Daarnaast is het mogelijk dat de submucosa oedemateus wordt en geïnfiltreerd met polynucleaire leucocyten. Ook kan ulceratie van het slijmvlies voorkomen. Deze exsudatieve reactie duurt echter veel langer dan de metoestrus. De periode, waarin deze histologische afwijkingen voorkomen, wordt de fase van de acute ontsteking genoemd.

Vervolgens ontwikkelen zich dysplastische afwijkingen van het epitheel, die een scala van histologische beelden omvatten. Opvallend zijn de ernstige differentiatiestoornissen. De normale regelmatige bouw van het epitheel is min of meer verdwenen terwijl het aantal basale en parabasale cellen is toegenomen. Cellen met intens eosinofiel cytoplasma verschijnen, die praktisch in alle lagen voor kunnen komen. De kern, die meestal wel beschadigd lijkt, blijft veelal aanwezig. Groepjes van deze cellen kunnen in cysteuze ruimten van het epitheel aangetroffen worden (VON HAAM en SCARPELLI, 1955). Het is mogelijk, dat micro-abscessen in het epitheel gevonden worden. De epitheelpapillen groeien uit en reiken soms tot diep in het stroma. De epitheeluitstulpsels kunnen een zeer grillig patroon tonen. De normale structuur van het epitheel kan aanzienlijk gewijzigd worden. Als de rangschikking van de cellen ernstig gestoord is spreken sommige auteurs van carcinoma in situ. Het intraepitheliale carcinoom zoals dat bekend is in de menselijke pathologie wordt echter zelden aangetroffen (REAGAN en WENTZ, 1959). SCARPELLI en VON HAAM (1960) menen dat deze vorm gedurende een korte tijd ook wel bij muizen voor kan komen. De potentie van het carcinogeen, de dosering en de methode van applicatie zouden de duur van het carcinoma in situ bepalen. De verwarring op dit punt wordt bevorderd doordat de criteria, die de auteurs aanleggen om de diagnose te kunnen stellen niet eensluidend zijn.

Zodra het epitheel infiltratief groeit spreekt men van microcarcinoom. Als de tumor groter wordt en in naburige organen groeit wordt de naam macrocarcinoom wel gebruikt. De tumor is een plaaveiscelcarcinoom waarin soms haardjes van slijmvormende cellen kunnen voorkomen. De meeste auteurs delen de tumoren in naar de differentiatiegraad (o.a. SCARPELLI en VON HAAM, 1957; THIERY, 1962; LI MIN-HSIN e.a., 1962).

De tumoren kunnen metastaseren in lymfeklieren, longen, nieren en lever (SCARPELLI en VON HAAM, 1960; THIERY, 1962).

d. *Electronenmicroscopisch waarneembare veranderingen*

SCARPELLI en VON HAAM (1963) bestudeerden het dysplastische epitheel. Cellen uit het stratum granulosum en stratum corneum tonen duidelijke afwijkingen. De voor een deel gezwollen mitochondrien zijn in aantal afgenomen. Een rond, 155 tot 435 m μ groot,

lichaampje wordt in sommige mitochondrien aangetroffen. Een dubbele membraan wordt hier en daar gezien om deze structuren, die de cristae vervormen. In normale cellen worden deze vormsels niet gevonden. De auteurs merkten op dat de aanwezigheid van deze intramitochondriale lichaampjes niet hoeft te betekenen, dat zich uit de betrokken cellen carcinoom zou moeten ontwikkelen. SCHRODT en FOREMAN (1965) vermelden ook deze structuren. Zij namen op lysosomen gelijkende structuren waar, die vóór het infiltratieve stadium in aantal toe zouden nemen. Het eerste teken van infiltratieve groei is het plaatselijk verdwijnen van de basale membraan. Desmosomen verdwijnen in het algemeen uit de kankercellen en de intercellulaire ruimten worden wijder (SCARPELLI en CARLETON, 1960). Door DE ROM e.a. (1959) werden zowel intra- als intercellulaire virus-achtige structuren in cervico-vaginale tumoren aangetroffen, die door benzo-pyreen bij C₃H-muizen opgewekt waren.

e. *Histochemische veranderingen*

Basale membraan. THIERY (1962) gebruikte de PAS (Periodic Acid Schiff)-reactie om het grensgebied tussen epitheel en bindweefsel te bestuderen. Onder het normale epitheel is een fel gekleurde band zichtbaar, die rondom kleine en grote tumoren onderbroken is. Aangezien deze auteur de oude definitie van een basale membraan hanteerde, noemde hij het beschreven gebied het sub-epitheliale bindweefsellaagje, omdat in de coupes, gekleurd met een haematoxyline-eosine oplossing, geen duidelijke membraan te zien is. Rondom brede epitheelwoekeringen wordt vaak een intact reticulinenetwerk aangetroffen, dat in geval van spitse of druppelvormige infiltratie meestal opgebroken is.

Glycogeen. De hoeveelheid glycogeen in tumoren weerspiegelt enigszins de differentiatiegraad van het gezwel (SCARPELLI en VON HAAM, 1960; THIERY 1962). Met de PAS-reactie vond THIERY (1962) in 18 % van het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom slijmvormende cellen.

Vetachtige stoffen. Sommige plaveiselcelcarcinomen zijn rijk aan vetachtige stoffen, die toegeschreven moeten worden aan de vetrijkdom van de verhoorde componenten (THIERY, 1962). Enkele anaplastische veldjes, die tevens een hoge aminopeptidase tonen, bevatten veel vet (THIERY en WILLIGHAGEN, 1964).

Nucleo-proteïnen. In neoplastische epitheliale cellen worden grote variaties in het DNZ-gehalte van de kernen aangetroffen. Vele tonen waarden, die corresponderen met een polyploid aantal chromosomen (SCARPELLI en VON HAAM, 1958). THIERY (1962) stelde vast, dat het DNZ-gehalte van kankercellen tweemaal zo groot is als dat van normale basale cellen gedurende de oestrus. Het RNZ-gehalte is in kankercellen toegenomen (SCARPELLI en VON HAAM, 1960). THIERY (1962) zag dat de intensiteit van de cytoplasmatische basofilie toeneemt met de ernst van de epitheelletsels.

f. Enzymhistochemische veranderingen

Alkalische fosfatase. De enzymactiviteit verdwijnt uit atypische en neoplastische basale elementen (THIERY, 1962).

Zure fosfatase. De hoogste activiteit wordt waargenomen in snelgroeïende anaplastische tumorcellen (SCARPELLI en VON HAAM, 1960). THIERY (1962) vond dat de activiteit van het enzym in kankercellen als regel zwak is, doch vergelijkbaar met die van normale basale cellen. In enkele carcinomen worden veldjes met vrij hoge activiteit aangetroffen.

5-nucleotidase. Hyperkeratotisch en dysplastisch epitheel hebben ongeveer dezelfde activiteit als normaal epitheel. In alle onderzochte tumoren wordt een hoge of zeer hoge enzymactiviteit aangetroffen (THIERY en WILLIGHAGEN, 1962). Ook blijkt dezelfde stijging zich in transplantaten van het carcinoom te handhaven. Een ascites-vorm van de tumor bevat geen activiteit; in solide tumoren die uit deze tumorvorm ontstaan kan het enzym ook niet aangetoond worden (THIERY en WILLIGHAGEN, 1964).

Adenosinetrifosfatase. In pathologisch veranderd en neoplastisch epitheel wordt vrijwel geen enzymactiviteit aangetroffen. Met deze methode komt het vaatpatroon der tumoren fraai uit (THIERY, 1962).

Niet specifieke esterasen. Atypische en maligne plaveiscellen tonen slechts een spoor activiteit. De intensiteit van de enzymactiviteit van neoplastische cellen is globaal wat minder dan van rijp epitheel (THIERY, 1962).

Aminopeptidase. In tumoren neemt de enzymactiviteit iets toe, vooral in anaplastische gebieden. Voor het grootste deel zou de stijging te wijten zijn aan de enzymactiviteit van het stroma en actieve macrofagen (THIERY, 1962).

β -Glucuronidase. VON HAAM en SCARPELLI (1960) vonden een stijging van de enzymactiviteit in dysplastisch epitheel en vitaal carcinoomweefsel. THIERY (1962) constateerde een sterk wisselende enzymactiviteit, die het sterkst was in anaplastische tumorcellen.

NADD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Diaforase). SCARPELLI en PEARSE (1958) namen een stijging waar van de enzymactiviteit. THIERY (1962) vond echter een wat afgenomen activiteit, behalve in de zeer anaplastische tumorcellen, die juist een stijging tonen.

Melkzuurdehydrogenase. Terwijl SCARPELLI en PEARSE (1958) een daling van de activiteit waarnamen, zag THIERY (1962) een uniform hoge activiteit in kankercellen.

β -Hydroxyboterzuurdehydrogenase. De zojuist genoemde auteurs namen een daling van de enzymactiviteit waar.

Glutaminezuurdehydrogenase. Een lichte stijging constateerden SCARPELLI en PEARSE (1958). THIERY en WILLIGHAGEN (1964) vonden een variabele activiteit; echter niet sterker dan in normale basale cellen.

α -Glycerofosfaatdehydrogenase. Hoewel SCARPELLI en PEARSE (1958) een stijging waarnamen, kon THIERY (1962) hoogstens een even grote enzymactiviteit aantonen als die van normale basale cellen.

NADPD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Fosfaat Diaforase). In tumoren vonden SCARPELLI en PEARSE (1958) een verhoogde enzymactiviteit. THIERY (1962) kon dit echter niet bevestigen.

Glucose-6-fosfaatdehydrogenase. Beide genoemde onderzoekers toonden in tumorweefsel een stijging aan.

Isocitroenzuurdehydrogenase. De activiteit komt overeen met zoals gevonden werd met de NADPD-techniek.

Als de tumor eenmaal ontwikkeld is blijken oestrogenen het enzympatroon niet te kunnen wijzigen. Blijkbaar vinden deze geen aangrijpingspunt meer in de tumorcellen (THIERY, 1962; THIERY en WILLIGHAGEN, 1964).

Uit dit literatuuroverzicht blijkt dat talrijke factoren gedurende de carcinogenese een rol spelen. Zowel de aard van het toegediende carcinogeen als het hormonale milieu van de proefdieren zijn van

belang. In de tumorcellen worden naast stoornissen van de celorganellen duidelijke enzymstoornissen aangetroffen. Nieuwe enzym-systemen zijn niet waargenomen maar wel duidelijke verschuivingen ten opzichte van de normale activiteit.

De talrijke experimenten hebben veel gegevens opgeleverd, die echter vaak moeilijk te correleren zijn. In de volgende hoofdstukken worden de resultaten vermeld, die verkregen zijn bij de verschillende verrichte onderzoeken, waarbij een poging gedaan wordt de verkregen kennis met de literatuurgegevens te correleren om een dieper inzicht in de carcinogenese te verkrijgen.

Hoofdstuk III

EEN MORFOLOGISCH ONDERZOEK VAN HET ZICH ONTWIKKELENDE CERVICO-VAGINALE CARCINOOM BIJ MUIZEN VAN DE C₃H-STAM MET BEHULP VAN HISTO- EN ENZYMHISTOCHEMISCHE TECHNIEKEN

INLEIDING

Uit het literatuuronderzoek bleek, dat ovariectomie gecombineerd met toediening van oestrogenen een bevorderende invloed kan hebben op het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom van de muis.

Een oriënterend onderzoek werd uitgevoerd om na te gaan of de ovariectomie onder de door ons gebezigde experimentele omstandigheden een grote rol speelt. Daartoe werden 2 groepen van 10 virginele C₃H-muizen gebruikt. Voordat de eerste penseling plaats vond, werd één groep door middel van een dubbelzijdige laparotomie geovariectomeerd. Na één week begon de behandeling, die bestond uit de toediening van 0,5 μ g oestradiol-17 β monobenzoaat, opgelost in olie (Dimenformon, Organon) tweemaal per week, terwijl driemaal per week de portio uteri gepenseeld werd met 20-methylcholanthreen opgelost in chloroform (1 g op 100 cc). Na 10 weken werden alle muizen opgeofferd. In de groep der normale muizen werden slechts 2 beginnende carcinomen waargenomen. Terwijl zich bij 2 van de geovariectomeerde muizen overeenkomstige afwijkingen ontwikkeld hadden, werden bij 6 van de overige 8 muizen uit deze groep duidelijke carcinomen gevonden.

Uit deze resultaten kan geconcludeerd worden dat ovariectomie zeer waarschijnlijk onder de beschreven omstandigheden een bevorderende invloed heeft op de ontwikkeling van het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom bij de muis.

Vervolgens werd een uitvoerig onderzoek ingesteld naar het histologisch patroon van dit zich ontwikkelende carcinoom. Tegelijkertijd werd de vraag gesteld of er ook morfologische aanwijzingen waren,

die de snellere groei van het carcinoom bij de met oestrogenen behandelde, geovariectomeerde muizen zouden kunnen verklaren.

Histo- en enzymhistochemische reacties werden uitgevoerd om eventueel afwijkende verschijnselen nader te preciseren:

A. MATERIAAL EN METHODIEK

Voor het onderzoek werden drie maanden oude, virginele muizen gebruikt van de genetisch zuivere C_3H -stam. Voedsel en water werden onbeperkt gegeven. De muizen werden verdeeld in twee groepen. Eén groep muizen werd één week voor de eerste penseling van het portiogebied door middel van een dubbelzijdige laparotomie onder aether-narcose gecastreerd. Histologisch onderzoek van het cervico-vaginale gebied van een aantal controle-dieren uit deze groep leerde dat het bekleedende epitheel bestond uit drie à vier lagen ongedifferentieerde cellen. Hier en daar werd aan de oppervlakte een slijmvormende cel aangetroffen (fig. 42). De structuur van het epitheel van de geovariectomeerde muizen gedurende de eerste penseling was dus bekend. Dit was echter niet het geval bij de normale muizen, aangezien de bouw van het epitheel afhankelijk is van de functionele toestand van de ovaria. Beide groepen muizen werden driemaal per week, gedurende 9 weken, gepenseeld op het portiogebied met een oplossing, die bestond uit 20-methylcholanthreen in chloroform (1 g op 100 cc). Een otoscoop werd daarbij in de vagina geschoven en de oplossing met behulp van een penseel op de portio gebracht. Met deze methode is het onvermijdelijk, dat de ingebrachte vloeistof zich enigszins verspreidt. Na de eerste penseling werd bij de geovariectomeerde muizen tweemaal per week $0,5 \mu\text{g}$ oestradiol- 17β monobenzoaat, opgelost in olie (Dimenformon, Organon) subcutaan ingespoten. Gedurende de gehele proef was de hormoonspiegel bij deze dieren vrij hoog. Hierbij werd een toestand geschapen, die niet te vergelijken is met een der bekende fysiologische toestanden van de muis. Bovendien werd in dit experiment geen rekening gehouden met de rol, die progesteron eventueel zou kunnen spelen tijdens de carcinogenese.

Gerekend vanaf het tijdstip van de eerste penseling werd van beide series muizen na één, twee, vier, zeven, tien, veertien, achttien en drie en twintig weken een groepje opgeofferd. Van de groep der normale muizen werden steeds 5 muizen tegelijkertijd onderzocht.

Een groepje met oestrogenen behandelde, geovariectomeerde muizen bestond behalve uit vier gepenseelde muizen uit twee controle-muizen, die niet gepenseeld waren.

De muizen werden gedood met aether. Hierna werd onmiddellijk de vagina met de vesica urinaria en het rectum *en bloc* uitgenomen. Het verkregen preparaat van alle geovariectomeerde muizen werd daarna ingevroren door middel van koolzuursneeuw. Het preparaat werd zodanig op het tafeltje gelegd, dat sagittale coupes vervaardigd konden worden. De aanwezigheid van de vesica urinaria en het rectum vergemakkelijkten de lokalisatie van de opgetreden afwijkingen (vgl. fig. 7). In een cryostaat werden 5 μ dikke coupes gesneden. Regelmatig werd een coupe gekleurd met de snelle haematoxyline-eosine methode, waarvoor gebruikt werd „Paragon Multiple Stain Frozen Sections”. Zodra afwijkingen waren te zien, werd het aantal benodigde coupes gesneden. Een deel der coupes werd gefixeerd in een formaline-oplossing en gebruikt voor de histochemische reacties. Het resterende weefsel werd gefixeerd in een formaline-oplossing en verwerkt via de paraffine-methode. Een klein deel van de normale muizen werd op dezelfde wijze behandeld. Er bleek voldoende materiaal te zijn verkregen om het zich ontwikkelende carcinoom bij deze groep ook histo- en enzymhistochemisch te karakteriseren. Het merendeel der preparaten van de normale muizen werd gefixeerd in de vloeistof van Bouin en verwerkt via de paraffinemethode. Alle preparaten werden minstens op vijftien sagittale doorsneden onderzocht.

De volgende histochemische reacties werden op de cryostaatcoupes uitgevoerd: Oil Red O, Sudan Black B, PAS (Periodic Acid Schiff) zowel voor als na behandeling met diastase, toluidine blauw en een reticulinekleuring. Enkele malen werd gebruik gemaakt van de volgende kleurreacties: Azan, van Gieson, een elastine- en een fibrinekleuring. Enige opmerkingen zullen gemaakt worden over de verschillende toegepaste kleuringen. Voor uitvoeriger gegevens wordt verwezen naar CASSELMAN (1962), PEARSE (1960) en de te noemen auteurs.

Oil Red O en Sudan Black B. Beide kleuringen berusten erop, dat de gebruikte kleurstof oplost in vetten en vetachtige stoffen. Meestal lossen deze stoffen ook op in het oplosmiddel van de kleurstof, hetgeen een moeilijk te vermijden nadeel is van deze kleur-

reacties. De oplosbaarheid van de kleurstof is o.a. afhankelijk van fysische eigenschappen der vetten. Indien het smeltpunt hoog is lossen de kleurstoffen nauwelijks op. De temperatuur speelt gedurende de reactie dus een belangrijke rol. De meeste in olie oplosbare kleurstoffen, zoals Oil Red O en Sudan Black B zijn azo-kleurstoffen. In tegenstelling tot Oil Red O is Sudan Black B licht basisch ten gevolge van de aanwezigheid van twee secundaire aminogroepen. Hierdoor kan Sudan Black B zich ook aan enige niet-vetachtige stoffen binden.

PAS (Periodic Acid Schiff)-reactie. Het principe van deze reactie is, dat een oxiderende stof, perijoodzuur, aldehyden in bepaalde substraten doet ontstaan. De stoffen, die hiervoor in aanmerking komen zijn polysacchariden, neutrale mucopolysacchariden, muco- en glycoproteïnen, glycolipiden, onverzadigde lipiden en fosfolipiden. Door het reagens van Schiff d.i. met zwaveligzuur ontkleurd basisch fuchsine, worden de aldehyden roodpaars gekleurd. Indien de coupe vóór de bewerking behandeld wordt met diastase, dat o.a. in speeksel voorkomt, verdwijnt het glycogeen, zodat daarna alleen de resterende stoffen aangetoond kunnen worden.

Toluidineblauw. De kleurstof wordt opgelost in water (0,5 %). Hiermee kan men die stoffen aantonen, die het verschijnsel metachromasie tevoorschijn kunnen roepen. Uitgaande van de oorspronkelijke, de zgn. orthochromatische kleur blauw treedt een kleurverandering op van violet naar rood. Naast zure mucopolysacchariden in het bindweefsel zijn mestcellen er fraai mee aan te tonen.

Zilverkleuring volgens Bielschowski, gewijzigd volgens GOMORI (ROMEIS, 1948). De kleuring werd gebruikt om reticulinevezels aan te tonen. Gedurende de reactie slaat zilver neer langs deze vezels. Men spreekt dan ook wel van argyrofiele vezels.

Azan-kleuring volgens HEIDENHAIN (ROMEIS, 1948). Meerdere bindweefselscomponenten worden blauw gekleurd; collage structuren toont men op deze wijze fraai aan.

Orceïne-kleuring volgens GURR (1958). Elastische vezels worden door orceïne donkerbruin gekleurd.

Fibrine-kleuring, de picro-Mallory methode volgens LENDRUM (1949).

De verrichte enzymhistochemische reacties waren:

- a. alkalische fosfatase; b. zure fosfatase; c. adenosinetrifosfatase;
- d. 5-nucleotidase; e. en f. niet specifieke esterasen (e. naftol AS-D

acetaatmethode; f. indoxylacetaatmethode); g. gereduceerd nicotinamide-adenine-dinucleotide-tetrazoliumreductase; h. melkzuurdehydrogenase; i. β -hydroxyboterzuurdehydrogenase; j. glutaminezuurdehydrogenase; k. gereduceerd fosfo-nicotinamide-adenine-dinucleotide-tetrazoliumreductase; l. glucose-6-fosfaatdehydrogenase; m. barnsteenzuurdehydrogenase en n. aminopeptidase.

De kleuringen a t/m f. en n werden uitgevoerd volgens voorschriften, die door PLANTEYDT (1962) in zijn proefschrift vermeld werden. Echter bij de onder f. genoemde reactie werd in plaats van 5-Br-indoxylacetaat het substraat 4-Cl-5-Br-indoxylacetaat gebruikt. Bij de kleuringen g tot en met m werden de coupes vóór de kleuring gedurende 30 minuten in aceton bij -20° C gebracht teneinde aanwezige lipide-druppels op te lossen. Deze bewerking werd uitgevoerd om absorptie van het bij de reactie gevormde formazan in vetdruppels te voorkomen.

De samenstelling van de incubatievloeistof voor NADH- en NADPH-tetrazoliumreductasen (g en k) was als volgt: 0,5 ml fosfaatbuffer, 0,2 M (pH = 7,6), 0,5 ml Nitro-BT (2 mg/ml), 1 ml aqua dest. waarin 4 mg NADH₂ resp. NADPH₂ is opgelost. De methode werd evenals voor de andere dehydrogenasen vermeld door PLANTEYDT (1962). De kleuring voor de barnsteenzuurdehydrogenase werd enigszins gewijzigd doordat aan de incubatievloeistof phenazine-methosulfaat toegevoegd werd, hetgeen een aanzienlijke verbetering van de methode blijkt te zijn (HARDONK, 1965).

De verschillende toegepaste enzymhistochemische reacties zullen nu worden besproken. Voor uitvoeriger gegevens wordt verwezen naar BURSTONE (1962), VAN DUIJN en WILLIGHAGEN (1961) en PEARSE (1960).

a. *Alkalische fosfatase (fosfomonoesterase I)*. Dit enzym katalyseert de reactie, waarbij monoesters van orthofosforzuur bij een optimale pH van 9,6 gesplitst worden. Het afgesplitste fosfaat wordt door in het incubatiemilieu voorkomende calciumionen neergeslagen als calciumfosfaat. Na substitutie tot cobaltsulfide is het zichtbaar als een bruinzwart neerslag.

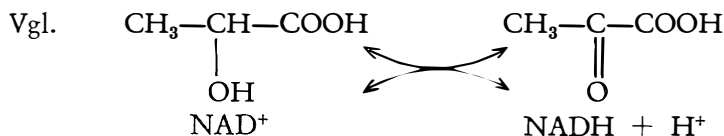
b. *Zure fosfatase (fosfomonoesterase II)*. Evenals alkalische fosfatase splitst dit enzym monoesters van orthofosforzuur, maar nu bij een optimale pH van 5,0. Het afgesplitste fosfaat wordt omgezet tot het bruinzwart gekleurde loodsulfide.

c. *Adenosinetrifosfatase (ATP-ase)*. Van het substraat adenosine-5'-trifosfaat wordt fosfaat afgesplitst, dat evenals een deel van de producten, die bij de a. en b. beschreven reacties vrijkomen, volgens het metaalzoutprincipe aangetoond wordt.

d. *5-Nucleotidase*. Dit enzym bevordert alleen de reactie, waarbij fosfaat afgesplitst wordt van adenosine-5'-monofosfaat. De optimale pH is 7,2. Het zichtbare product is bruinzwart van kleur.

e. en f. *Niet specifieke esterasen*. Esters van eenvoudige alifatische carbonzuren worden door deze enzymen gesplitst. Als substraat werd gebruik gemaakt van naftol AS-D acetaat en 4-Cl-5-Br-indoxylacetaat. De afgesplitste naftolgroep wordt zichtbaar gemaakt door deze te koppelen aan een diazoniumzout. Het gevormde indoxyl wordt geoxideerd tot indigo. Beide produkten zijn blauw van kleur.

g. en k. *NADH- en NADPH-tetrazoliumreductasen*. Bij talrijke oxidatieve processen, die zich in de cel afspelen wordt waterstof aan bepaalde substraten onttrokken. De dehydrogenasen bevorderen de reacties, waarbij aan de zgn. waterstofdonoren waterstofatomen onttrokken worden. Vele dehydrogenasen hebben voor hun werking een co-enzym nodig. Als voorbeeld noemen we het nicotinamide-adenine-dinucleotide (NAD), dat als een soort co-substraat opgevat kan worden, aangezien voor ieder molecuul, dat geoxideerd wordt een molecuul NAD nodig is.



Meestal zijn nog een reeks processen nodig, voordat de waterstofatomen met zuurstof water vormen. Het NADH kan zijn waterstof slechts overdragen aan een toegevoegde acceptor, een tetrazoliumzout in geval van de enzymhistochemische reactie, in de aanwezigheid van een enzymstelsel, dat gereduceerd nicotinamide-adenine-dinucleotide-tetrazolium-reductase genoemd wordt. Theoretisch is het voorstelbaar, dat in het weefsel wel van NAD-afhankelijke enzymen voorkomen, maar geen NADH-tetrazoliumreductase. Indien men met de tetrazoliumzoutmethode geen NAD-afhankelijke enzymen

kan aantonen krijgt dit pas betekenis als het NADH-tetrazolium-reductase wel aanwezig is. Er zijn ook dehydrogenasen, die als co-enzym nicotinamide-adenine-dinucleotide-fosfaat (NADP) nodig hebben. Het NADPH-tetrazoliumreductase is nodig om waterstofatomen over te dragen aan een tetrazoliumzout. Het gevormde formazan is als een blauw gekleurd neerslag waarneembaar.

NAD-afhankelijke enzymen:

h. *Melkzuurhydrogenase*. Dit enzym speelt een belangrijke rol in de glycolyse (Embden-Meyerhof). Het melkzuur wordt daarbij geoxideerd tot pyrodruivenzuur, dat in de citroenzuurcyclus (cyclus van Krebs) opgenomen wordt.

i. *β -Hydroxyboterzuurdehydrogenase*. Dit enzym bevordert de reactie, waarbij β -hydroxyboterzuur omgezet wordt tot β -ketoboterzuur. Deze reactie kan een bepaalde rol in de vetzurstofwisseling spelen.

j. *Glutaminezuurdehydrogenase*. Bij de oxidatieve de-amineringsprocessen van aminozuren speelt het L-glutaminezuurdehydrogenase een belangrijke rol. Als producten verschijnen dan α -ketoglutaarzuur en ammoniak. Het is een zeer verspreid voorkomend enzym en van belang voor de eiwitstofwisseling.

NADP-afhankelijke enzymen:

l. Wij toonden alleen het *glucose-6-fosfaatdehydrogenase* aan, dat de reactie bevordert, waarbij waterstof aan glucose-6-fosfaat onttrokken wordt. Gluconzuur-6-fosfaat wordt hierbij gevormd. Dit enzym speelt een voorname rol in de pentose-cyclus.

m. *Barnsteenzuurdehydrogenase*. Dit enzym blijkt zonder co-enzym werkzaam te zijn. Bij de reactie wordt barnsteenzuur geoxideerd tot fumaarzuur. Dit is een belangrijk proces in de citroenzuurcyclus.

n. *Aminopeptidase*. Het gebruikte substraat was L-leucyl- β -naftylamide. Het afgesplitste naftylamide geeft met het diazoniumzout Garnet GBC een oranje-rood gekleurd neerslag. De coupes dienen vrij snel na de uitvoering van de reactie bekeken te worden, aangezien de gevormde kleurstof niet stabiel is.

B. VERANDERINGEN VAN HET VAGINA- EN CERVIXSLIJMVLIES BESTUDEERD AAN DE HAND VAN DE MET HAEMATOXYLINE-EOSINE GEKLEURDE COUPES.

a. *Morfologische afwijkingen bij normale muizen*

De eerste penseling met de 1 % oplossing van 20-methylcholanthreen in chloroform vond plaats op epitheel, dat naar gelang het stadium van de oestruscyclus hoog of laag was. Reeds vanwege dit feit zijn de muizen uit deze groep niet geheel met elkaar vergelijkbaar. Na één week werden de eerste 5 muizen opgeofferd. Bij alle 5 werden ernstige beschadigingen waargenomen van zowel het epitheel als het bindweefsel. Het epitheel toonde zowel degeneratieve als regeneratieve veranderingen. Op sommige plaatsen was het epitheel zelfs geheel verdwenen. Elders werd een toename gevonden van de dikte van de basale cellaag. De activiteit van deze cellaag bleek uit het aantal delingsfiguren. De kernen toonden enige polymorfie. Hoewel meestal differentiërende cellen aanwezig waren, was het stratum corneum dikwijls verdwenen. Diffuus verspreid door het epitheel en aan de oppervlakte werden losliggende of in groepjes gelegen polynucleaire leucocyten aangetroffen. De grens met het onderliggende bindweefsel was onregelmatig (fig. 8); soms werden in het beschadigde bindweefsel enige degenererende epitheelcellen gezien. Het bindweefsel toonde alleen tekenen van beschadiging; het bestond uit een vezelige, licht eosinofiele substantie, waarin verspreid voor een groot deel pycnotische kernen lagen. De vaatjes waren verwijd. Buiten dit gebied tot voorbij de soms verdwenen tunica muscularis vaginae werden polynucleaire leucocyten aangetroffen. Bij voorkeur bevonden zich de afwijkingen aan de rectale zijde van het vaginaslijmvlies in de omgeving van het achterste gewelf. (vgl. fig. 7). De afwijkingen van het cervixepitheel stonden sterk op de achtergrond.

Bij bestudering van de muizen, die later opgeofferd werden bleek dat de epitheelafwijkingen progressief waren. Zeven weken na de eerste penseling ontstonden papillaire uitstulpingen van het epitheel in het stroma, waardoor het grensvlak epitheel-bindweefsel opmerkelijk groter werd. Grotere en kleinere papillomateuze epitheelwoekeringen wisselden elkaar af (fig. 9). Het epitheel toonde nu nog duidelijker differentiatiestoornissen. Het stratum corneum

verdween geheel en slechts hier en daar waren resten van het stratum spinosum terug te vinden. Tegelijkertijd werden dyskeratotische cellen diffuus verspreid door het epitheel waargenomen waarvan het cytoplasma sterk eosinofiel was en de donkere pycnotische kernen soms uiteengevallen waren (fig. 10). Naarmate de tijd voortschreed namen de afwijkingen toe (fig. 11). De snelheid van het proces verschilde van muis tot muis. De epitheelpapillen groeiden soms grillig uit, waardoor merkwaardige histologische beelden ontstonden.

Van de groep muizen, die na 18 weken opgeofferd werden, waren er twee, waarbij losliggende epitheelveldjes aangetroffen werden, zodat hier carcinoom ontstaan was. Het grootste carcinoom bevatte hoornparels (fig. 23), waaruit bleek dat deze tumor in staat was het verhoorningsproces van het normale cervico-vaginale epitheel na te bootsen. De beschreven epitheelafwijkingen werden ook in dit carcinoom waargenomen. Na 23 weken werd bij één muis een klein carcinoom gevonden. De bindweefselbeschadigingen, die na een week verschenen waren, verdwenen geleidelijk. Lichte tot matige ontstekingsverschijnselen waren echter altijd aanwezig.

b. *Morfologische afwijkingen bij na ovariectomie met oestrogenen behandelde muizen*

Bij alle muizen vond de eerste penseling plaats op ongedifferentieerd drie- tot vierlagig epitheel (fig. 42). Cyclische wisselingen in de hormoonspiegel werden ondervangen door tweemaal per week subcutaan oestrogenen toe te dienen. De muizen waren dus meer met elkaar vergelijkbaar dan de muizen uit de vorige groep. Na één week werden reeds opvallende afwijkingen van het epitheel en het bindweefsel waargenomen. Degeneratieve en regeneratieve veranderingen traden zowel in het epitheel als in het bindweefsel op. Het epitheel was plaatselijk geheel verdwenen; elders werden epitheelgebiedjes aangetroffen, die een vrij normaal gedifferentieerd patroon toonden. Tussen deze uitersten werden allerlei overgangen gevonden. Soms was de basale laag opmerkelijk in dikte toegenomen; soms bestond de gehele epitheellaag zelfs voornamelijk uit basale cellen. De activiteit was af te lezen uit het aantal kerndelingsfiguren. Het grensvlak met het sterk beschadigde bindweefsel was onregelmatig; uitstulpsels van epitheelcellen in het stroma waren

soms talrijk. Het gedegenerende bindweefsel bestond uit een homogene, wat vezelige, eosinofiele substantie, waartussen verspreid pycnotische kernen lagen. Het endotheel van de sterk verwijde vaatjes was dikwijls verdwenen; het lumen van deze vaten was gevuld met erythrocyten. Grenzend aan deze laag werd al vrij spoedig granulatiweefsel aangetroffen (fig. 12). Jonge vaten groeiden, soms via praeëxistente structuren in de richting van het epitheel (fig. 13, 14 en 15). Afzonderlijk of in groepjes gelegen polynucleaire leucocyten werden zowel in het epitheel als in het stroma gezien. De zone tussen het epitheel en het bindweefsel werd vervolgens ingenomen door een netvormig gerangschikte licht eosinofiele substantie, jonge bindweefselcellen, epitheelcellen en polynucleaire leucocyten (fig. 16 en 17). Naarmate deze zone groter werd verdween het kernarme vezelige bindweefsel. De epitheelcellen toonden intussen duidelijke morfologische veranderingen. Van differentiatie was nog slechts een spoor te zien. Opvallend was de sterke polymorfie en atypie der kernen, die een of meer nucleoli bevatten (fig. 17). De vitaliteit van de afgedruppelde epitheelcellen was kenbaar aan de kerndelingsfiguren. Alle muizen behalve één toonden na één en twee weken deze histologische veranderingen.

Bestudering van de preparaten van de muizen, die later opgeofferd werden leerde, dat de afgedruppelde epitheelcellen door deling en appositie groepjes vormden (fig. 21), waardoor soms weer contact met het erboven gelegen epitheel werd verkregen (fig. 23). Naast de beschreven epitheelwoekeringen ontstonden in de omgeving soms papillaire epitheeluitstulpsels, zoals bij de normale muizen konden verschijnen.

Vier weken na de eerste penseling werden bij drie van de vier muizen solitair groeiende epitheelvelden in het stroma aangetroffen, zodat zich nu infiltrerende carcinomen ontwikkeld hadden. Deze tumoren toonden hetzelfde patroon als het carcinoom, dat in fig. 27 afgebeeld is. In totaal werden bij 20 van de 32 muizen, die deze serie vormden, één of meer carcinomen aangetroffen. De tumoren namen geleidelijk in grootte toe en infiltreerden de naburige organen: de vesica urinaria, het rectum en het peritoneum. De grootste tumor was zo groot als een kers. Het aangrenzende epitheel van de vagina en portio liet vaak afwijkingen zien zoals reeds voor het infiltratieve stadium aangetroffen werden. Het ontwikkelende car-

cinoom toonde dikwijls meerdere histologische beelden, die onderscheiden werden in:

1. Gedifferentieerde tumorvelden (fig. 30). Het tumorweefsel was opgebouwd uit cellen vergelijkbaar met de cellen, die in het epitheel van de vagina en cervix gedurende de oestrus normaal voorkomen. Vergeleken met het normale differentiatieproces waren hier echter duidelijke stoornissen. Hoewel het overeenkomstige stratum basale en stratum spinosum meestal goed ontwikkeld waren ontbrak het stratum granulosum en het stratum corneum. Goed gevormde hoornparels werden slechts zelden gezien. Verspreid door het tumorweefsel werden dikwijls dyskeratotische cellen aangetroffen en polynucleaire leucocyten.

2. Minder gedifferentieerde tumorvelden (fig. 31). De differentiatiestoornissen stonden hier sterker op de voorgrond. In deze tumoren verschenen cisteuze structuren. In de gevormde holten werden soms talrijke kernhoudende epitheelcellen aangetroffen.

3. Niet gedifferentieerde tumorvelden.

- a. Er waren grote, in brede strengen groeiende tumorvelden, die opgebouwd waren uit op basale cellen gelijkende kankercellen. Soms werden enige dyskeratotische cellen waargenomen. In het algemeen was er vrij weinig stroma (fig. 32).

- b. Ook waren er sprietvormige tumorvelden, die kriskras door het stroma, dat hier domineerde, groeiden (fig. 33).

Vele tumoren bevatten ook groepjes slijmvormende cellen, zoals die na ovariectomie of gedurende de pro-oestrus in het vagina- en cervixslijmvlies aangetroffen worden. Het tamelijk losmazige stroma was soms doorzaaid met polynucleaire leucocyten. Meerdere carcinomen waren opgebouwd uit zowel gedifferentieerde als anaplastische tumorvelden. Hoewel deze serie muizen zich niet leende voor statistisch onderzoek werd wel de indruk verkregen, dat naarmate de tijd vorderde de differentiatie afnam.

Bij microscopisch onderzoek van de regionale lymfeklieren en bij macroscopisch onderzoek van de grote organen werden geen metastasen aangetroffen. Bij beide groepen muizen werden na 9 weken de portio-penselingen gestaakt. De ontwikkeling van de epitheelafwijkingen tot tumorgroei ging evenwel door. In de laatste groep nam de grootte der tumoren toe en de differentiatiegraad waarschijnlijk af.

C. RESULTATEN VAN HET HISTOCHEMISCH ONDERZOEK

a. *Histochemische bevindingen in het normale cervico-vaginale slijmvlies*

Het drie- tot vierlagige epitheel van de geovariectomeerde muis bevatte slechts diffuus verspreid enkele vetbolletjes. In de slijmcellen bevond zich een PAS-positieve, diastase resistente, metachromatische substantie. Tussen het epitheel en het bindweefsel verliep een ononderbroken PAS-positieve membraan, waartussen plaatselijk fijne argyrofiele vezeltjes lagen. Met de Azan-kleuring werd dit laagje lichtblauw gekleurd. Met orceine gekleurde vezeltjes verliepen deels onregelmatig, deels gericht naar het epitheel in het stroma. De submucosa bevatte PAS-positief materiaal; in mindere mate werd dit ook gevonden in het dieper gelegen stroma. Met de Azan-kleuring kleurde het bindweefsel zich blauw. Metachromatisch materiaal werd in het stroma niet gezien behalve in de mestcellen.

Toediening van oestrogenen werd gevolgd door de vorming van verhoornend, meerlagig plaveiselcelepitheel. Het stratum corneum bevatte enig vettig materiaal; in het stratum spinosum was nu de PAS-reactie op glycogeen positief. De basale membraan toonde histochemisch nagenoeg hetzelfde beeld. Het stroma werd oedemateus. Mogelijk door opname van vocht was de PAS-reactie zwakker in het bindweefsel. Enig diffuus verspreid metachromatisch materiaal werd in het bindweefsel aangetroffen.

b. *Histochemische bijzonderheden van het zich ontwikkelende carcinoom*

Vetachtige stoffen. Overal waar hoornmateriaal gevormd werd kon vet aangetoond worden.

Glycogeen. Zodra het epitheel beschadigd was bleek het glycogeen voor een groot deel uit de cellen verdwenen te zijn (fig. 18). In het dysplastische epitheel werd alleen glycogeen aangetroffen in ten dele gedifferentieerde cellen (fig. 28). Ook in de gezwollen zelf bleek het glycogeengehalte samen te hangen met het vermogen tot differentiatie. Er werden evenwel ook weinig gedifferentieerde tumorvelden aangetroffen waarin een opmerkelijke hoeveelheid glycogeen voorkwam (fig. 34). Deze stof werd zelfs soms in op

basale cellen gelijkende kankercellen gezien. In anaplastisch tumorweefsel kwam praktisch geen glycogeen voor. Het glycogeengehalte bleek binnen zekere grenzen een maat te zijn voor de differentiatie.

Mucopolysacchariden. In vrij veel tumoren werden eilandjes gevonden, die opgebouwd waren uit slijmcellen. De inhoud bleek uit een metachromatische substantie te bestaan, die ook PAS-positief, diastase-resistent was.

c. Histochemische bijzonderheden van de basale membraan en het bindweefsel gedurende de carcinogenese

Daar geen duidelijke stoornissen aan de basale membraan bij de behandelde, normale muizen door ons werden gevonden, worden alleen de afwijkingen, die zich voordeden bij de met oestrogenen behandelde, geovariectomeerde muizen beschreven. Na één week bleek de PAS-positieve basale membraan sterk in dikte te wisselen en plaatselijk verdwenen te zijn. In de zone waar epitheel- en bindweefselcellen door elkaar heen lagen werden brede, brokkelige PAS-positieve membranen aangetroffen. Tussen de cellen lag een zwak PAS-positief netwerk, bestaande uit een egaal kleurende substantie (fig. 18). Waarschijnlijk waren deze structuren het gevolg van een gedeeltelijke depolymerisatie van de basale membraansubstantie. Bij volledige depolymerisatie was niets meer te zien.

De afgedruppelde epitheelcellen bleken de normaal aanwezige argyrofiele vezeltjes voor zich uit te duwen; plaatselijk was dit netwerkje onderbroken (fig. 22). In dit afwijkende gebied waren de argyrofiele vezeltjes in aantal toegenomen. Dit gold ook voor de elastische vezels, die in dit gebied lagen. Deze waren eveneens wat dikker geworden en voor een deel gebroken. Ook bleken de elastische membraantjes van de aanwezige vaten in het gedegenerende bindweefsel beschadigd te zijn. In de wand van deze vaatjes werd PAS-positief materiaal en vette stoffen gevonden. Het beschadigde bindweefsel kleurde donkerblauw met de Azan-kleuring en was licht argentofiel zodat geconcludeerd kan worden dat hier collagenisatie van het bindweefsel plaats gevonden had. Min of meer loodrecht op het epitheel lagen in deze zone elastische vezels. Vooral met de bindweefselkleuringen werd duidelijk, dat zodra jong bind-

weefsel met vaatjes naar het epitheel groeide de beschadigde bindweefsellag onderbroken was. Het is zeer wel mogelijk, dat de jonge vaatspruiten langs de praeëxistente elastische vezels groeiden. Met de fibrinekleuring kon geen fibrine in dit afwijkende weefsel aangetoond worden.

De meeste ontwikkelde tumorvelden bleken door een zwak PAS-positief gekleurde zone van het bindweefsel gescheiden te zijn. Deze zone ging onopgemerkt over in de tussensubstantie van de bindweefselcellen. Om enkele tumorveldjes werd evenwel een scherp afgelijnd, PAS-positieve membraan aangetroffen (fig. 35). Ook werden soms fraaie reticuline-vezels om tumorvelden gezien (fig. 36). Blijkbaar was hier weer een basale membraan gevormd. Dit verschijnsel werd nooit waargenomen om anaplastische, sprietvormige tumorgebieden.

D. RESULTATEN VAN HET ENZYMISTOCHEMISCHE ONDERZOEK

a. *Enzymhistochemische bevindingen in het normale cervico-vaginale slijmvlies*

In tabel I worden de resultaten vermeld, verkregen bij de bestudering van het slijmvlies en het eronder gelegen weefsel van vagina en portio afkomstig van geovariectomeerde muizen voor en na behandeling met oestrogenen. Voor het bepalen van het enzympatroon van het slijmvlies van gecastreerde muizen zonder oestrogenen werd gebruik gemaakt van vier muizen één week na de ovariectomie. De overige muizen werden genomen uit de met oestrogenen behandelde, geovariectomeerde serie om het enzympatroon te bepalen. Dit laatste is rechts in tabel I weergegeven.

A l k a l i s c h e f o s f a t a s e. Bij de dieren, die geen hormonen gekregen hadden, toonden de slijmcellen van het lage epitheel enige activiteit. De activiteit in de submucosa was sterker dan in het dieper gelegen stroma. De vaatjes en het spierweefsel waren matig tot sterk actief. Na toediening van oestrogenen werd het enzym in wisselende sterkte in de onderste lagen van het epitheel aangetroffen; in het stratum corneum was een lichte activiteit waarneembaar. Het verschil in enzymactiviteit tussen de submucosa en het dieper gelegen stroma was nu voor een groot deel verdwenen. De toename van het oedeem van het stroma zal hiervoor gedeeltelijk verantwoordelijk

Tabel I
Het enzympatroon van het vagina- en portioslijmvlies van geovariectomeerde C₃H-muizen

	Vóór behandeling met oestrogenen					Na behandeling met oestrogenen						
	oppervl. slijncellen	basale cellen	submucosa	dieper gelegen stroma	tunica muscul. vaginae	stratum corneum	stratum granulosum	stratum spinosum	stratum basale	submucosa	dieper gelegen stroma	tunica muscul. vaginae
Alk. fosfatase	±	—	+	±	++	+	+/-	++/-	++/-	±	±	++
Zure fosfatase	—	±/-	±	—	—	+++	++/-	—	±/-	±	—	—
ATP-ase	—	—	++	+	+++	±	±	—	—	+	±	+++
5-Nucleotidase	—	—	—	—	+++	+	++/+	++/-	+/-	±	—	+++
NADH-tetrazoliumreductase	+++	+++	+	+	+	±/-	++	++	+++	+	+	++
Melkzuurdehydrogenase	++	++	+	+	+	—	+	+	++	+	+	+
β-Hydroxyboterzuurdehydr.	++	++	+	—	—	—	±	+	++	—	—	—
Glutaminezuurdehydr.	±	±	—	—	—	—	—	±	±	—	—	—
NADPH-tetrazoliumreductase	+++	+++	+	+	+	±/-	+++	+++	+++	+	+	++
Glucose-6-fosf.dehydr.	++	++	±	±	+	—	++	++	++	±	±	+
Barnsteenzuurdehydr.	+	+	±	±	+	—	+	+	+	±	±	+
Indoxylesterase	++	±/-	—	—	—	±/-	—	±/-	±/-	—	—	—
Naftol AS-D esterase	++	±/-	—	—	—	±/-	—	±/-	±/-	—	—	—
Aminopeptidase	±/-	—	±/-	±/-	±/-	—	—	±/-	±/-	±/-	±/-	±/-

Verklaring der tekens: —, ±, +, ++, +++ resp. geen, spoor, zwakke, matige en sterke activiteit. / = wisselend.

zijn. In het epitheel was het neergeslagen cobaltsulfide vooral aan de celmembraan gelocaliseerd.

Zure fosfatase. In de basale cellen en in de submucosa van beide groepen werd een spoor activiteit aangetroffen. Na oestrogenen toonde het stratum corneum een sterke enzymactiviteit. Het loodsulfide bevond zich voornamelijk als kleine korreltjes in het cytoplasma.

ATP-ase. Het epitheel liet slechts na behandeling van de muizen met oestrogenen een spoor activiteit zien. Vooral de submucosa van de geovariectomeerde muizen toonde een matige activiteit, die na oestrogenen weer minder werd.

5-Nucleotidase. Zonder oestrogenen was noch in het epitheel, noch in het bindweefsel enige enzymactiviteit aan te tonen. De vaten en het spierweefsel waren daarentegen sterk positief. Nadat oestrogenen toegediend waren trad enzymactiviteit op in alle lagen vooral in het stratum spinosum en granulosum. Ook in de submucosa werd neerslag van loodsulfide aangetroffen.

NADH- en NADPH-tetrazoliumreductasen. In beide groepen bleken alle structuren deze enzymen te bevatten. Het formazan was deels als een diffuus blauw neerslag waarneembaar. De enzymactiviteit van het NADPH-tetrazoliumreductase was gemiddeld wat sterker dan van de andere reductase. De verdeling van de enzymactiviteit stemde met elkaar overeen. Opvallend was het neerslag van de formazankorrels waardoor in de basale cellen ogenschijnlijk een lijntje gevormd werd (fig. 19).

NAD- en NADP-afhankelijke enzymen. Hier werd eerst de activiteit geregistreerd nadat een indruk verkregen was van het a-specifieke blauwe neerslag, dat soms in de blanco coupes waarneembaar was. Het verdelingspatroon stemde overeen met dat van de reeds genoemde tetrazoliumreductasen. Opgemerkt werd dat hoewel de enzymactiviteit van het β -hydroxyboterzuurdehydrogenase in het epitheel matig was er praktisch niets in het bindweefsel aangetoond kon worden.

Niet specifieke esterasen. Vooral in de slijmcellen werd een matige enzymactiviteit waargenomen. Diffuus verspreid door het epitheel was een spoor aanwezig. In het stroma bleek soms een enkele cel zwakke activiteit te tonen.

Aminopeptidase. Slechts hier en daar werd onregelmatig een spoortje oranje gekleurd neerslag gezien.

Het meerlagige verhoornde plaveiselcelepitheel van de cervix was lager dan van de vagina. Enkele enzymen met name alkalische fosfatase, zure fosfatase, ATP-ase en 5-nucleotidase toonden een opmerkelijke sterkere activiteit in het cervixepitheel.

b. *Enzymhistochemische bijzonderheden van het zich ontwikkelende carcinoom*

Alleen de resultaten, die verkregen werden bij de groep der geovariectomeerde muizen, die met oestrogenen behandeld waren, worden vermeld (vgl. tabel II). Het enzympatroon van de slijmvliesveranderingen, die bij de normale muizen optraden, was namelijk gelijk aan overeenkomstige afwijkingen, die in de vorige groep voorkwamen.

A l k a l i s c h e f o s f a t a s e. De enzymactiviteit was uit de basale cellen van het beschadigde epitheel vrijwel geheel verdwenen; evenals uit de afdruppelende epitheelcellen. Ook in het atypische epitheel met de diepe epitheelpapillen was nauwelijks activiteit aantoonbaar. De tumorcellen van het min of meer gedifferentieerde carcinoom toonden soms een spoortje enzymactiviteit. Overal waar hoorn voorkwam was enige activiteit waarneembaar. Hoewel de enzymactiviteit in het afwijkende epitheel en in de meeste tumorvelden praktisch nihil was, bleek een zeer sterke activiteit aanwezig te zijn in een deel der anaplastische, sprietvormige tumorvelden.

Z u r e f o s f a t a s e. In het afwijkende epitheel werd evenals in de tumor slechts hier en daar een spoortje activiteit gevonden. Eventueel aanwezig hoornmateriaal kleurde sterk. Hoewel het grootste deel der onderzochte tumoren slechts nu en dan zwakke activiteit toonde werden enkele anaplastische tumorveldjes aangetroffen met sterke enzymactiviteit. Vooral in de zone, die na een week waarneembaar werd tussen het epitheel en het beschadigde bindweefsel werden zure fosfatase bevattende cellen aangetroffen.

A T P - a s e. Zowel het afwijkende epitheel als het tumorweefsel toonde slechts plaatselijk een spoortje activiteit. Met deze techniek kan het vaatpatroon nauwkeurig waargenomen worden. Dit was vooral van belang bij de bestudering van de eerste slijmvliesafwijkingen. Meerdere voorbeelden werden aangetroffen waaruit bleek dat vanuit het granulatiweefsel vaatjes ontsprongen, die zich naar het epitheel boorden. (fig. 15). Zodra tussen het epitheel en het bescha-

digde bindweefsel een zone was ontstaan, waarin epitheelcellen afdruppelden werden steeds veel vaatjes aangetroffen.

5 - N u c l e o t i d a s e. De enzymactiviteit was in het degeneratieve en regeneratieve epitheel sterk afgenomen. In de afgedruppelde cellen was niets aanwezig. Hoewel in de papillomateuze epitheelformaties, die bij normale muizen ontstonden, geen enzymactiviteit aanwezig was, werd in het dysplastische epitheel, dat bij met oestrogenen behandelde, geovariectomeerde muizen ontstond soms wel activiteit aangetroffen (fig. 26). Zodra een infiltrerend carcinoom ontstaan was werd een sterke enzymactiviteit gevonden (fig. 29). Zowel de intensiteit als de lokalisatie was in tumorweefsel niet vergelijkbaar met de enzymactiviteit van het normale epitheel. In op basale cellen gelijkende tumorcellen werd een zeer sterk gestegen enzymactiviteit waargenomen. Bij bestudering van de diverse vormen van tumorweefsel bleken zeer sterke schommelingen voor te komen. Naast donkerbruin gekleurde gebieden waren er velden zonder enige aanduiding van activiteit (fig. 37). Dit enzym bleek ook geschikt te zijn voor de bestudering van het vaatpatroon.

D e h y d r o g e n a s e n. De afwijkingen, die na één en twee weken optraden, waren o.a. gekenmerkt door een onregelmatige grens tussen epitheel en bindweefsel. Het ogenschijnlijk aanwezige blauwe lijntje, dat in normaal epitheel gevormd wordt door de regelmatige rangschikking van de formazankorrels, was nu verdwenen (fig. 20). In tegenstelling tot de vrijwel geheel verdwenen enzymactiviteit in het beschadigde bindweefsel was de enzymactiviteit van de meeste dehydrogenasen sterk gestegen in de jonge bindweefselcellen, die onder het afwijkende epitheel gevormd waren (fig. 20). Opvallend was dat het β -hydroxyboterzuurdehydrogenase ook hier niet aanwezig was. De enzymactiviteit van de gedifferentieerde tumorvelden week niet duidelijk af van de activiteit van het normaal verhoornde plaveiselcepitheel. Naarmate de differentiatie afnam bleek de enzymactiviteit voor de meeste dehydrogenasen te stijgen (fig. 38, 39 en 41). De enzymactiviteit van het β -hydroxyboterzuurdehydrogenase was evenwel duidelijk gedaald (fig. 40), hoewel de activiteit in de meest anaplastische gebiedjes weer steeg.

N i e t s p e c i f i e k e e s t e r a s e n. Hoewel de activiteit normaal al zwak was werd wel duidelijk, dat de enzymactiviteit in het afwijkende epitheel en in tumorweefsel gedaald was.

Tabel II

Het enzympatroon van het zich ontwikkelende cervico-vaginale carcinoom maal per week op de portio uteri gepenseeld werden met een 1⁰/₆-oplossing twee meest links gelegen kolommen de enzymactiviteit weergegeven van vagina en de cervix.

	vagina/portio	cervix	hyperplasie	dysplasie	degenererend epitheel
Alk. fosfatase	++/-	++	++/-	+/-	+/-
Zure fosfatase	±/-	±	±/-	±/-	±/-
ATP-ase	—	+	±/-	±/-	±/-
5-Nucleotidase	+/-	++	±/-	±/-	±/-
NADH-tetrazoliumreductase	+++	+++	+++	+++ / ++	+++ / ++
Melkzuurdehydrogenase	++	++	++	++ / +	++ / +
β-Hydroxyboterzuurdehydr.	++	++	++	++ / +	++ / +
Glutaminezuurdehydr.	±	±	±	±	±
NADPH-tetrazoliumreductase	+++	+++	+++	+++ / ++	+++ / ++
Glucose-6-fosf. dehydr.	++	++	++	++ / +	++ / +
Barnsteenzuurdehydr.	+	+	+	+ / ±	+ / ±
Indoxylesterase	±/-	±/-	±/-	±/-	±/-
Naftol AS-D esterase	±/-	±/-	±/-	±/-	±/-
Aminopeptidase	±/-	±/-	±/-	±/-	±/-

Verklaring der tekens: —, ±, +, ++, +++, ++++ resp. geen, spoor,

Aminopeptidase. Bepaalde gedeelten van anaplastisch tumorweefsel toonden een duidelijke stijging van de enzymactiviteit. Enkele afwijkende epitheelgebieden, die in de omgeving van infiltrerend carcinoom lagen, bleken een verhoogde activiteit van het aminopeptidase te bezitten.

In tabel II worden de belangrijkste enzymhistochemische bevindingen samengevat. Onder hyperplasie van het epitheel wordt verstaan een verbreding van het gehele epitheel waarbij de verhouding van de verschillende cellagen ten opzichte van elkaar normaal gebleven is. In degenererend epitheel komen veel te gronde gaande cellen voor. Regenererend epitheel bevat een toegenomen aantal basale cellen terwijl gedifferentieerde elementen in de minderheid zijn. Onder dysplastisch epitheel wordt verstaan epitheel met verbreding en ver-

bij geovariectomeerde, met oestrogenen behandelde C₃H-muizen, die drie- van 20-methylcholanthreen in chloroform. Ter vergelijking wordt in de de basale cellen van meerlagig verhoornend plaveiselcelepitheel van de

regenererend epitheel	afdruppelend epitheel	gediff. carcinoom	minder gediff. carcinoom	anaplast. carcinoom (grote velden)	anaplast. carcinoom (sprietv. velden)
+ + / -	± / -	± / -	± / -	± / -	± / -
± / -	± / -	± / -	± / -	± / -	+ + / -
± / -	± / -	± / -	± / -	± / -	+ / -
± / -	-	+ + / ±	+ + / ±	+ + + / -	+ + + / -
+ + +	+ + + / + +	+ + +	+ + +	+ + + + / + + +	+ + + +
+ +	+ +	+ +	+ +	+ + + / + +	+ + +
+ +	+ + / +	+ + / +	+ + / +	+ / ±	+ + / ±
±	±	±	±	±	±
+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + + +	+ + + +
+ +	+ +	+ +	+ +	+ + + / + +	+ + +
+	+	+	+	+ + / +	+ +
± / -	± / -	± / -	± / -	-	-
± / -	± / -	± / -	± / -	-	-
± / -	-	+ / -	+ / -	+ + / -	+ + / -

lichte, matige, sterke en zeer sterke activiteit. / = wisselend.

dieping der epitheelpapillen en opvallende differentiatiestoornissen, meestal worden dyskeratotische cellen gezien (fig. 24 en 25). Het afdruppelende epitheel wordt voornamelijk aangetroffen bij de met oestrogenen behandelde, geovariectomeerde muizen (fig. 21). De overige genoemde beelden zijn reeds uitvoerig ter sprake geweest.

Ter vergelijking wordt in tabel II het enzympatroon opgenomen van de basale cellen van het vagina- en cervixepitheel, dat voorkomt bij de met oestrogenen behandelde muizen, waarbij ovariectomie plaats gevonden had.

Via hyperplasie en dysplasie van het epitheel kan zich een carcinoom ontwikkelen. Ook kan vóór het dysplastische stadium het slijmvlies veranderingen tonen, die gekenmerkt worden doordat epitheelcellen afdruppelen in een gunstig tumorbed. Het is waar-

schijnlijk zelfs mogelijk dat via deze weg het dysplastische stadium overgeslagen wordt. Hoe een carcinoom zich ontwikkelt is afhankelijk van de op dat ogenblik aanwezige omstandigheden.

E. BESPREKING DER RESULTATEN

De ontwikkeling van het carcinoom verliep bij de normale muizen op dezelfde wijze zoals reeds door meerdere auteurs beschreven werd (o.a. SCARPELLI en VON HAAM, 1957; LI MIN-SHIN e.a., 1962; THIERY, 1962).

De verschillende stadia kunnen op de volgende wijze onderscheiden worden:

1. *Fase van de acute ontsteking.* Naast degeneratieve veranderingen van epitheel en bindweefsel worden diffuus verspreid polynucleaire leucocyten aangetroffen. Hoewel aanvankelijk enkele epitheelcellen kunnen afdruppelen gaan deze alle te gronde.

2. *Fase van de dysplastische epitheelafwijkingen.* Er ontstaat vrij snel regeneratie in het epitheel. Een duidelijke verschuiving vindt plaats naar een generatie van jonge basale cellen met verlies van een aantal differentierende en gedifferentieerde cellen. Indien het aantal basale cellen overheerst en enige polymorfie der kernen waarneembaar is spreken sommige auteurs van carcinoma in situ (o.a. THIERY, 1962; VON HAAM, 1964). In ons materiaal troffen we geen afwijkingen aan, die vergelijkbaar waren met het intraepitheliale carcinoom van de portio uteri bij de vrouw. Hierbij immers is er een scherpe grens tussen normaal plaveiselcelepitheel en carcinoma in situ, hetgeen wij als karakteristiek kenmerk zien voor het intraepitheliale carcinoom. Bij de muis werden dergelijke beelden door ons niet waargenomen. Alle auteurs, die het carcinoma in situ bij de muis diagnostiseerden, merkten op dat deze afwijking slechts een kortdurend bestaan had en snel overging in min of meer ernstige dysplastische veranderingen. Of direct uit het carcinoma in situ zich een infiltrerend carcinoom kan ontwikkelen werd uit de literatuur niet duidelijk. REAGAN en WENTZ (1959) ontkenden het voorkomen van carcinoma in situ bij de muis. Waarschijnlijk is het mogelijk door de dosering en de frequentie van de applicatie van het carcinogeen te verlagen veranderingen te krijgen, die wel vergelijkbaar zijn met het intraepitheliale carcinoom zoals bij de mens kan worden waargenomen.

Alle histologische beelden, die na de ontstekingsfase ontstonden en tot carcinoom leidden werden door ons dysplastisch epitheel genoemd. Vooral in deze groep komen afwijkingen voor, die afhankelijk van locale of algemene factoren regressie of progressie kunnen gaan tonen. LAFFARGUE e.a. (1963) onderscheidden benigne en maligne dysplastische epitheelafwijkingen.

Uit ons onderzoek bleek dat ondanks het staken van de toediening van het carcinogeen na de negende week de ernst der dysplastische afwijkingen toch toenam. In de achttiende week werd voor het eerst carcinoom aangetroffen. Deze waarnemingen bevestigden het onderzoek van CHRISTOPHERSON en BROGHAMER (1961). Nadat geconstateerd was dat dysplastische epitheelveranderingen ontstaan waren staakten deze onderzoekers de behandeling. Na negentien weken werden carcinomen waargenomen. Uit ons onderzoek bleek de ernst der epitheelafwijkingen vrij sterk te wisselen, want hoewel in de achttiende week reeds een duidelijk carcinoom ontstaan was, werd slechts bij één muis van de groep, die na drie en twintig weken opgeofferd was, een klein carcinoom aangetroffen. Voor een deel vindt deze waarneming zijn verklaring in het feit, dat de muizen op het tijdstip, waarop ze gepenseeld waren zich in een verschillend stadium van de oestruscyclus bevonden. In het begin van de periode, waarin de muizen gepenseeld worden, blijkt de normale oestruscyclus niet gestoord te zijn (VON HAAM, 1964). Dat dit van belang zou kunnen zijn veronderstelde STEIN-WERBLOWSKY (1960), die bij twee van de 53 ratten, die gedurende de dioestrus gepenseeld waren een carcinoom waarnam. Hij vond echter geen carcinoom bij de ratten, die tijdens de oestrus behandeld waren.

De door ons waargenomen histo- en enzymhistochemische afwijkingen bleken voor een groot deel overeen te komen met de gegevens van SCARPELLI, PEARSE (1958) en THIERY (1962). Het glycogeen-gehalte van het dysplastische epitheel was verminderd of voor een deel verdwenen. De activiteit van de enzymen alkalische fosfatase en 5-nucleotidase was eveneens verminderd of zelfs geheel niet waarneembaar. Ook was de activiteit van sommige dehydrogenasen iets afgenomen. Stijgingen van bepaalde enzymen werd in dit stadium niet gezien.

In tegenstelling tot het zich ontwikkelende carcinoom bij de normale muizen bleek het carcinoom bij de met oestrogenen behandelde

muizen, waarbij ovariectomie plaats gevonden had, opvallend snel te ontstaan. Reeds na vier weken werd bij drie van de vier muizen een infiltrerend carcinoom aangetroffen. Een verklaring hiervoor werd gevonden in de histologische beelden, die bij de eerder opgeofferde muizen waargenomen waren. Het bleek dat de vorming van een tumorbed, dat bestond uit jonge actieve fibroblasten, van grote betekenis was. Reeds na één week werd dit proces gezien. Deze bindweefselcellen zijn waarschijnlijk meegevoerd door de jonge vaat-spruiten, die dwars door het beschadigde bindweefsel naar het epitheel groeiden. Dit kwam goed uit met de 5-nucleotidase en ATP-ase techniek, waarmee de vaten sterk gekleurd werden. Het is evenwel ook mogelijk dat resterende bindweefselcellen onder invloed van het gunstig geworden milieu zich snel vermeerderden. De activiteit van de jonge bindweefselcellen uitte zich door de vrij sterke werkzaamheid van de dehydrogenasen. Het β -hydroxyboterzuur- en glutaminezuurdehydrogenase kwamen er echter niet in voor. Het afwijkende epitheel bleek vrijwel tegelijkertijd door de deels verdwenen basale membraan in deze zone te infiltreren. Het enzymhistochemische patroon van deze afdruppelende cellen kwam overeen met dat van het dysplastische epitheel, zodat we deze afwijkingen niet tot carcinoom rekenden.

Deze beelden kwamen overeen met die welke FISCHER (1906) beschreef, nadat hij scharlakenrood in olijfolie in de subcutis van het oor van een konijn had gebracht.

Het belang van de vorming van fibroblasten voor de infiltratieve groei, zoals door VASILIEV (1958) naar voren gebracht is, konden wij ten volle steunen.

Zodra solitair groeiende epitheelvelden ontstaan waren ontstonden opmerkelijke verschuivingen in de enzymactiviteit. Vergelijking van het enzympatroon dat in de verschillende tumorvelden waargenomen werd (tabel II) leert, dat sterke wisselingen zelfs in één tumorgebied zich kunnen voordoen. Gemiddeld bleken de volgende enzymen minder werkzaam te zijn: alkalische fosfatase, β -hydroxyboterzuurdehydrogenase en de niet-specifieke esterasen. Een stijging van de enzymactiviteit werd van de volgende enzymen waargenomen: 5-nucleotidase, NADH-tetrazoliumreductase, melkzuurdehydrogenase, NADPH-tetrazoliumreductase, glucose-6-fosfaatdehydrogenase, barnsteenzuurdehydrogenase en het aminopeptidase. De enzymactiviteit

van de meeste enzymen was gestegen in de anaplastische tumorcellen.

Een opvallend verschijnsel was de vorming van een basale membraan om bepaalde tumorvelden. Evenals ASHWORTH e.a. (1961) menen wij, dat dit een uiting is van een zekere rusttoestand van de tumor. Blijkbaar probeert het lichaam tot een nieuw evenwicht te komen met de woekerende celsoort. Genoemde waarnemingen duiden erop, dat in één en dezelfde tumor naast elkaar tumorvelden voorkomen, die in meerdere eigenschappen van elkaar verschillen. Het is waarschijnlijk dat het evenwicht ten opzichte van de gastheer van de verschillende delen van een tumor niet gelijk is. De veronderstelling wordt geuit dat progressie, stabilisatie en regressie in een en dezelfde tumor tegelijkertijd op kunnen treden.

Het enzympatroon van de tumoren, die bij de met oestrogenen behandelde, geovariectomeerde muizen ontstaan waren, kwam overeen met het patroon, dat SCARPELLI en PEARSE (1958) en THIERY en WIL-LIGHAGEN (1964) vonden in tumoren, die opgewekt waren met een ander carcinogeen, opgelost in een ander oplosmiddel. De geringe verschillen, die door de onderzoekers waargenomen werden, zijn waarschijnlijk niet van grote betekenis en kunnen voor een deel verklaard worden door een verschil in differentiatiegraad der tumoren. Concluderend kan gezegd worden dat chemisch verwekte cervico-vaginale carcinomen, onafhankelijk van de wijze van ontstaan, hetzelfde enzympatroon bezitten.

Uit het eindproduct van een tumorproces kan men in het algemeen weinig of niets te weten komen van de mechanismen en de factoren, die tijdens de ontwikkeling een rol gespeeld hebben.

Uit dit experiment blijkt duidelijk de promotie-bevorderende werking van oestrogenen. Het anatomisch substraat bestond uit de vorming van een gunstig tumorbed. In hoeverre oestrogenen als initierende agentia of co-carcinogenen zouden kunnen werken komt in de volgende hoofdstukken ter sprake.

In het volgende hoofdstuk zal vooral aandacht geschonken worden aan de beïnvloeding van het carcinogenetische proces door geslachtshormonen.

Hoofdstuk IV

ENIGE FACTOREN VAN INVLOED OP DE ONTWIKKELING VAN HET CHEMISCH VERWEKTE CERVICO-VAGINALE CARCINOOM BIJ MUIZEN VAN DE C₃H-STAM

INLEIDING

In dit hoofdstuk worden een aantal experimenten en de resultaten ervan vermeld, waardoor meer inzicht verkregen zou kunnen worden in enige factoren, die tijdens de carcinogenese mogelijk van belang zijn. Aangezien bekend is dat zelfs het in geringe mate irriterende oplosmiddel aceton aanleiding kan geven tot op gezwellen lijkende afwijkingen (VON HAAM, 1964) was het zeker nodig de invloed van het door ons gebruikte chloroform op de carcinogenese na te gaan. Voorts zijn er enige aanwijzingen, dat de hoogte van het epitheel waarop gepenseeld wordt van invloed zou kunnen zijn op de ontwikkeling van het kankerproces (STEIN-WERBLOWSKI, 1960). Ook een hierop gericht onderzoek werd uitgevoerd. Een reeks experimenten werd opgezet om meer kennis te verwerven over de invloed der geslachtshormonen op de ontwikkeling van het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom.

A. MATERIAAL EN METHODIEK

Drie maanden oude, virginele muizen van de genetisch zuivere C₃H-stam werden voor de verschillende onderzoeken gebruikt. Voedsel en water werden onbeperkt gegeven. Eén week voordat de eerste penseling van het portiegebied plaats vond, werden de muizen door middel van een dubbelzijdige laparotomie onder aetheranacose gecastreerd.

Algemeen wordt aangenomen dat endogene oestrogenen en progesteron één week na ovariectomie praktisch niet meer aanwezig zijn (LAMMES, 1963). Als regel werden de experimenten na 10 weken

beëindigd, omdat daarna mogelijke complicaties zoals secundaire bijnierhyperplasie en bijniertumoren kunnen ontstaan, hetgeen zeker van betekenis kan zijn bij de C₃H-muis (SMITH, 1948; WOOLLEY, 1950). Deze afwijkingen gaan dikwijls gepaard met een verhoogde uitscheiding van oestrogenen in de urine, anatomische verschijnselen van toegenomen oestrogene activiteit inbegrepen verhoorning van het vaginaslijmvlies, cysteuze hyperplasie van het endometrium en mammahyperplasie (DORFMAN en GARDNER, 1944; GARDNER, 1941).

Alle muizen werden in de loop van twee weken op de portio uteri gepenseeld via een otoscoop. Eén dag na de eerste penseling werd begonnen met het toedienen van een bepaalde hoeveelheid hormonen, die daarna gedurende de gehele proefduur gegeven werd. Om een continue hormoonspiegel te bereiken werd tweemaal per week een in olie oplosbaar preparaat subcutaan ingespoten. Aan het einde van ieder experiment werden de muizen met aether gedood en het cervico-vaginale gebied *en bloc* met het rectum en de vesica urinaria uitgenomen en gefixeerd in de vloeistof van Bouin. In het algemeen werden steeds groepjes van 10 muizen opgeofferd. Aangezien door toevallige omstandigheden dit aantal soms iets veranderd werd, is in de tabellen aangegeven hoe groot de betreffende groep was. Via de paraffinetechniek werden de preparaten verwerkt. Gemiddeld werden ongeveer tien sagittale doorsneden van één preparaat onderzocht. Uit een oriënterend onderzoek was gebleken dat op deze wijze een representatief beeld werd verkregen van de afwijkingen. Van het cervico-vaginale gebied van enige gepenseelde muizen werden loodrecht op de lengte as van de vagina coupes vervaardigd. Nieuwe gezichtspunten kwamen hierbij niet naar voren. In principe werd gebruik gemaakt van de kennis, verkregen uit de in hoofdstuk III beschreven experimenten. Een eenvoudige indeling gebaseerd op de beschreven histologische beelden werd gebruikt om de gegevens te ordenen.

a. *Slijmvliesafwijkingen zonder afdruppeling van epitheelcellen.* Het slijmvlies toonde behalve degeneratieve veranderingen soms ook duidelijke regeneratie van het epitheel. Het onder het epitheel gelegen bindweefsel was ernstig beschadigd (fig. 12).

b. *Slijmvliesafwijkingen met afdruppeling van epitheelcellen* (fig. 17). De basale membraansubstantie was deels of geheel gedepolymeriseerd terwijl ter plaatse jonge bloedvaten en bindweefselcellen aan-

getroffen werden. De onder a. en b. genoemde laesies werden voornamelijk bij muizen aangetroffen, die veertien dagen na de eerste penseling opgeofferd werden.

c. *Dysplasie, graad I.* Naast toename van het aantal basale cellen werden differentiatiestoornissen waargenomen. De epitheelpapillen werden breder en dieper.

d. *Dysplasie, graad II.* De veranderingen waren nu meer uitgesproken.

e. *Dysplasie, graad III.* Meestal bleek het niet goed mogelijk deze afwijkingen scherp te onderscheiden van een beginnend carcinoom. Enkele malen werd enzymhistochemisch onderzoek verricht waarbij bleek dat ook de grens met deze techniek niet scherp getrokken kon worden. Het enzym 5-nucleotidase ontbreekt in uitgesproken dysplastisch epitheel en is sterk gestegen in carcinoomweefsel (fig. 29). Fig. 26 geeft een beeld van een overgangsfase.

f. *Carcinoom.* Los van het oppervlakte epitheel werden in het stroma duidelijk solitair groeiende epitheelvelden waargenomen.

B. DE INVLOED VAN HET OPLOSMIDDEL CHLOROFORM IN COMBINATIE MET OESTROGENEN OP HET ZICH ONTWIKKELENDE CARCINOOM

Uit de in hoofdstuk III beschreven experimenten was gebleken dat oestrogenen bij geovariectomeerde muizen na een tijdsverloop van 23 weken slechts hyperplasie van het vagina- en cervixepitheel veroorzaakt hadden. Uit een later in dit hoofdstuk beschreven experiment (blz. 76, exp. I) bleek dat 20-methylcholanthreen opgelost in chloroform onder de gegeven experimentele omstandigheden bij geovariectomeerde muizen geen laesies veroorzaakt had, die in verband met het carcinogenetische proces gebracht kon worden.

De mogelijkheid dat chloroform in combinatie met oestrogenen wel van invloed zou kunnen zijn was niet uitgesloten. Twee groepen van 30 muizen werden gebruikt om een antwoord op deze vraag te krijgen. Eén week na de dubbelzijdige ovariectomie kregen alle muizen tijdens de gehele proef tweemaal per week 2,5 μ g oestradiol-17 β monobenzoaat subcutaan toegediend. In de loop van de eerste 2 weken werd de portio van één groep muizen zesmaal gepenseeld met chloroform. Als controlegroep werd de serie muizen gebruikt uit experiment III (blz. 76). Deze muizen werden gepenseeld met een 1 % oplossing van 20-methylcholanthreen in chloroform. Na 2, 6

en 10 weken werd van iedere serie muizen een groep opgeofferd. De resultaten zijn in tabel III samengevat.

Tabel III.

De invloed van chloroform op de ontwikkeling van het cervico-vaginale carcinoom.

aantal weken na de eerste penseling	chloroform							20-methylcholanthreen in chloroform						
	A	a	b	c	d	e	f	A	a	b	c	d	e	f
2	10	10						10	5	5				
6	10				3	7		10			1	1	8	
10	10			1	2	7		12			1	4	6	1

In de tabel is tevens ter vergelijking een overeenkomstig experiment opgenomen, waarbij in het chloroform 20-methylcholanthreen opgelost was (1 %).

A = aantal muizen; a = slijmvliesafwijkingen zonder afdruppeling van epitheelcellen; b = slijmvliesafwijkingen met afdruppeling van epitheelcellen; c = dysplasie, graad I; d = dysplasie, graad II; e = dysplasie, graad III; f = carcinoom.

Uit dit onderzoek blijkt dat chloroform in combinatie met oestrogenen verantwoordelijk is voor het afdruppelen van epitheelcellen dwars door de deels verdwenen basale membraan heen tot tussen de hieronder nieuwgevormde bindweefselcellen. Indien 20-methylcholanthreen aan de oplossing toegevoegd was bleken deze slijmvliesveranderingen opmerkelijk minder omvangrijk te zijn. Daarom zal 20-methylcholanthreen waarschijnlijk een remmend effect hebben op de ontwikkeling van deze afwijkingen. Na 6 weken hadden zich in beide groepen duidelijke dysplastische afwijkingen ontwikkeld, die overeenkomen met de in fig. 24 afgebeelde slijmvliesveranderingen. Een verschil werd niet waargenomen. In de groep van de alleen met chloroform behandelde muizen waren na 10 weken geen carcinomen ontstaan, daarentegen werd bij één muis uit de controlegroep een beginnend carcinoom aangetroffen. De groepen zijn evenwel te klein om hieraan een bepaalde conclusie te verbinden.

Hoewel onder deze omstandigheden chloroform in combinatie met oestrogenen geen carcinoom veroorzaakt had, bleek wel de belangrijke invloed die chloroform zowel op het epitheel als het eronder gelegen stroma tijdens dit proces heeft. Deze invloed kwam nog duidelijker naar voren in een experiment, dat tegelijkertijd met de proeven, die in de inleiding van hoofdstuk III besproken werden,

uitgevoerd werd. Bij 4 van 10 geovariectomeerde muizen, die gedurende 10 weken behandeld waren met oestradiol-17 β monoben-zoaat (tweemaal per week 0,5 μ g) en gepenseeld op de portio uteri met chloroform (driemaal per week), werd een beginnend carcinoom waargenomen. In tegenstelling tot de muizen uit het vorige experi-ment, die slechts gedurende 2 weken met chloroform gepenseeld waren, werden deze muizen gedurende de gehele proef, dus 10 we-ken, behandeld met chloroform.

Bij muizen uit een overeenkomstige proef, waarbij in plaats van chloroform fysiologisch zout gebruikt werd, werden geen afwijkingen gevonden. In de groep muizen, die gedurende de gehele proef ge-penseeld waren met een 1 % oplossing van 20-methylcholanthreen in chloroform hadden zich na 10 weken 8 carcinomen ontwikkeld (zie inleiding hoofdstuk III). Het was dus waarschijnlijk dat 20-methylcholanthreen ook een bevorderende invloed had op het kankerproces.

C. DE INVLOED VAN DE HOOGTE VAN HET EPITHEEL TIJDENS DE EERSTE PENSELING VAN DE PORTIO UTERI OP HET ZICH ONTWIKKELENDE CARCINOOM

Bij alle in dit hoofdstuk IV besproken experimenten werd gebruik gemaakt van geovariectomeerde muizen, waarbij de eerste penseling uitgevoerd werd op epitheel, dat 3 à 4 cellagen dik was. Enkele oppervlakkige cellen ervan toonden slijmvorming. De delingsactivi-teit van dit lage epitheel was gering in tegenstelling tot epitheel, dat onder invloed van oestrogenen stond. In hoeverre deze anatomische en functionele toestand van belang zou zijn voor de ontwikkeling van het chemisch verwekte carcinoom werd nagegaan in het vol-gende experiment.

Twee series van 30 muizen werden hiertoe gebruikt. Vanaf de zevende dag na de castratie werd in de loop van 2 weken de portio uteri gepenseeld met een 1 % oplossing van 20-methylcholanthreen in chloroform. Twee dagen voordat de eerste penseling plaats vond, werd bij één groep muizen 2,5 μ g oestradiol-17 β monoben-zoaat sub-cutaan ingespoten. Bij enige controledieren bleek deze dosis ruim vol-doende te zijn om in deze periode van 2 dagen een hoog verhoornend plaveiselcelepitheel te vormen. De eerste penseling vond dus plaats

op dit hoge epitheel. Als controlegroep werd de groep muizen uit experiment III (blz. 76) gebruikt, waarbij de eerste penseling op laag epitheel uitgevoerd werd (fig. 42). De muizen uit beide groepen kregen gedurende de proef tweemaal per week 2,5 μ g oestradiol-17 β monobenzoaat toegediend. Na 2, 6 en 10 weken werd van iedere serie een groepje opgeofferd. De resultaten van dit onderzoek worden samengevat in de volgende tabel, die op dezelfde wijze opgesteld is als na het vorige beschreven experiment.

Tabel IV.

De invloed van de hoogte van het epitheel tijdens de eerste penseling op de ontwikkeling van het cervico-vaginale carcinoom.

aantal weken na de eerste penseling	hoog epitheel							laag epitheel						
	A	a	b	c	d	e	f	A	a	b	c	d	e	f
2	11	7	4					10	5	5				
6	10				1	5	4	10			1	1	8	
10	13				2	8	3	12			1	4	6	1

De controle reeks is gelijk aan die, welke in tabel III gebruikt werd. Voor de verklaring der tekens wordt verwezen naar het onderschrift van tabel III. (blz. 71).

De slijmvliesafwijkingen bleken iets minder ernstig te zijn, indien de eerste penseling plaats vond op hoog epitheel. Bij de bestudering van vroegtijdige slijmvliesveranderingen zou het daarom misschien van belang kunnen zijn aandacht te besteden aan de anatomische structuur van epitheel, waarop de eerste maal de te testen stof wordt gebracht.

D. DE INVLOED DER GESLACHTSHORMONEN OP DE ONTWIKKELING VAN HET CHEMISCH VERWEKTE CERVICO-VAGINALE CARCINOOM

Een tiental experimenten werd opgezet zoals reeds onder het hoofd materiaal en methodiek beschreven werd (blz. 69). Iedere groep bestond als regel uit 30 muizen. Eén week na dubbelzijdige ovariectomie werd in de loop van 2 weken de portio uteri zesmaal gepenseeld met een 1 % oplossing van 20-methylcholantheen in chlo-roform. Bovendien werd bij alle muizen, behalve bij die uit experiment I, gedurende de gehele proef tweemaal per week, vanaf de dag na de eerste penseling, een bepaalde hoeveelheid geslachtshor-

monen subcutaan toegediend. De doseringen per week worden in tabel V weergegeven. Na 2, 6 en 10 weken werd als regel een groepje van 10 muizen opgeofferd en de slijmvliesveranderingen geregistreerd.

Tabel V.

Overzicht van de hoeveelheden geslachtshormonen, die tijdens de experimenten I tot en met X toegediend werden.

nr. van het experiment	Oestradiol-17 β monobenzoaat μ g/week	progesteron mg/week
I		
II	1	
III	5	
IV	15	
V		1
VI		4
VII		10
VIII	1	1
IX	1	10
X	15	10

Van alle groepen werden de muizen één week vóór de proef geovariectomeerd. Daarna werd in de loop van 2 weken de portio uteri zesmaal gepenseeld met een 1% oplossing van 20-methylcholanthreen in chloroform.

Alvorens tot de bespreking van de resultaten over te gaan, volgt eerst een korte beschouwing over de betekenis, die gehecht kan worden aan de hoeveelheid der toegediende geslachtshormonen in vergelijking met de fysiologisch voorkomende hormoonspiegels.

Gegevens, die exact de fysiologische spiegels van de geslachtshormonen bij proefdieren weergeven, werden in de literatuur niet gevonden. Er zijn wel experimenten bekend, waaruit het één en ander enigszins af te leiden is. LAMMES (1963) bestudeerde het morfologische beeld en het enzympatroon van de uterus van de O₂₀ muis. Indien aan een castraat 0,5 μ g oestradiol-17 β monobenzoaat gegeven werd, waren na 48 uur in het endometrium duidelijke morfologische veranderingen met een bepaald enzympatroon te zien. Als 0,2 μ g van het hormoon per dag gegeven werd ontstond, vooral merkbaar aan het epitheel, een overeenkomstig enzympatroon.

Gedurende pseudo-zwangerschap is er een duidelijke progesteron-

secretie, hetgeen tot uiting kan komen b.v. door de inductie van deciduomen. Indien aan een castraat gedurende 4 dagen 0,25 of 0,50 mg progesteron gegeven werd kon het effect nagebootst worden. Vier x 0,10 mg progesteron gaf een overeenkomstig enzympatroon. Deciduoomvorming leek een te grof criterium om de beïnvloeding van progesteron na te gaan. De verschijnselen waren vooral in het stroma merkbaar. Bij de bestudering van de wisselwerking tussen oestradiol en progesteron bleken zowel antagonistische als synergistische effecten op te treden. Niet de absolute hoeveelheid van de aanwezige hormonen, maar de verhouding tussen beide hormonen bepaalt welk beeld ontstaat. Ook uit dit onderzoek bleek dat de hoeveelheid oestrogenen benodigd om een bepaald fysiologisch effect te bereiken veel kleiner is dan de hoeveelheid progesteron. De normale verhouding is ongeveer 1 : 500-1000 (EMMENS, 1950).

De invloed van oestrogenen op de ontwikkeling van het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom

Experiment I

Alle muizen, die na 2 weken opgeofferd werden bleken overeenkomstige slijmvliesafwijkingen te tonen. Naast degeneratieve veranderingen van het epitheel en het eronder gelegen bindweefsel waren duidelijke regeneratieverschijnselen van het epitheel te zien. Deze activiteit was na 6 en 10 weken verdwenen. Het epitheel was dan opgebouwd uit 3 à 4 cellagen met in de oppervlakkige lagen enige slijmcellen. Het gedegenererde bindweefsel bleek vervangen te zijn door fibreus bindweefsel.

Experiment II

Van de 9 muizen, die na 2 weken geobduceerd werden, bleken er 4 slijmvliesafwijkingen te tonen, waarbij epitheelcellen in het bindweefsel afgedruppeld waren (fig. 17). Bij één van de overige muizen had zich reeds een duidelijk infiltrerend carcinoom ontwikkeld. Na 6 en 10 weken werden dysplastische afwijkingen aangetroffen van verschillende graad. In de omgeving van de epitheelafwijkingen bleek het bindweefsel soms duidelijk fibreus te zijn en doorwoekerd met mononucleaire en enkele polynucleaire leucocyten (fig. 25). Na 10 weken werd bij één muis een klein carcinoom gevonden.

Experiment III

In principe werden dezelfde afwijkingen aangetroffen; de ernst van de dysplastische epitheelafwijkingen was enigszins toegenomen.

Experiment IV

In vergelijking met de slijmvliesafwijkingen, die in groep II en III verschenen waren, bleek een duidelijke uitbreiding te hebben plaats gevonden, want reeds na 2 weken toonden 8 van de 10 muizen afdruppeling van epitheelcellen. Na 6 en 10 weken werden in beide groepen 3 carcinomen aangetroffen. De laatste groep, waarin de grootste tumor voorkwam, bestond bovendien slechts uit 8 muizen; gedurende de proef waren namelijk 3 muizen om onverklaarbare redenen doodgegaan.

In tabel VI wordt de invloed van oestrogenen op het zich ontwikkelende tumorproces samengevat.

Tabel VI.

De invloed van oestrogenen op de ontwikkeling van het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom.

nr. exp.	wk.	o/w	A	a	b	c	d	e	f	x	xx	xxx
I.	2		10	10								
	6		10									
	10		10									
II.	2		9	4	4				1	1		
	6	1	10			3	6	1				
	10		12			2	5	4	1	1		
III.	2		10	5	5							
	6	5	10			1	1	8				
	10		12			1	4	6	1	1		
IV.	2		10	2	8							
	6	15	10				4	3	3	1	2	
	10		8					5	3	2		1

Verklaring der tekens: nr. exp. = nummer van het experiment; wk = het aantal weken na de eerste penseling, waarop de muizen opgeofferd werden; o/w = de hoeveelheid oestradiol-17 β monobenzoaat, die per week toegediend werd (in μ g); A = aantal muizen van de groep; a = slijmvliesafwijkingen zonder afdruppeling van epitheelcellen; b = slijmvliesafwijkingen met afdruppeling van epitheelcellen; c = dysplasie, graad I; d = dysplasie, graad II; e = dysplasie, graad III; f = carcinoom; x = enkele losliggende epitheelveldjes; xx = meerdere losliggende epitheelveldjes; xxx = epitheelveldjes tot en in de naburige organen.

De invloed van progesteron op de ontwikkeling van het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom

Experiment V, VI en VII

Alleen twee muizen uit experiment V toonden na 2 weken enige afdruppeling van het epitheel. Bij alle overige muizen werden naast degeneratieve veranderingen van het epitheel en het bindweefsel slechts regeneratie van het epitheel gevonden. Aan de oppervlakte werden enige slijmcellen aangetroffen. Na 6 en 10 weken werd bij alle muizen 3-4 lagig epitheel gevonden met fibreus stroma, waarin soms een enkel mononucleair ontstekingsinfiltraatje voorkwam. Invloed van progesteron werd onder de beschreven experimentele omstandigheden dus niet waargenomen.

Tabel VII.

De invloed van progesteron op de ontwikkeling van het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom.

nr. exp.	wk.	p/w	A	a	b	c	d	e	f
V.	2		10	8	2				
	6	1	10						
	10		10						
VI.	2		10	10					
	6	4	10						
	10		10						
VII.	2		10	10					
	6	10	10						
	10		10						

p/w = de hoeveelheid progesteron, die per week toegediend werd (in mg). Zie voor de verklaring der overige tekens het onderschrift van tabel VI (blz. 76).

De invloed van de combinatie oestrogenen en progesteron op de ontwikkeling van het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom

Experiment VIII

Hoewel na 2 weken geen duidelijk verschil gevonden werd met de resultaten uit experiment II bleken na 6 en 10 weken toch verschuivingen opgetreden te zijn. Er werden nu 2 resp. 5 carcinen aangetroffen. Na 10 weken bleek zelfs één der tumoren het rectum geïnfiltreerd te hebben.

Experiment IX

Opmerkelijk waren de slijmvliesveranderingen, die zich onder invloed van deze combinatie oestrogenen en progesteron ontwikkeld hadden. Een brede laag, opgebouwd uit slijmcellen, had zich aan de oppervlakte gevormd (fig. 44). Vooral het epitheel van de vagina toonde dit verschijnsel. Vergeleken met de resultaten uit experiment II waren er na twee weken minder muizen met afdruppelend epitheel. Na 6 en 10 weken bleken de veranderingen echter verergerd te zijn; er werden nu resp. 2 en 3 carcinomen aangetroffen (fig. 45).

Experiment X

Evenals in experiment IV hadden zich bij het overgrote deel der muizen na 14 dagen slijmvliesafwijkingen ontwikkeld, gepaard met afdruppeling van epitheelcellen in een zone, die bestond uit een deels uit elkaar gevallen basale membraansubstantie, bloedvaatjes en fibroblasten. Na 6 en 10 weken werden duidelijk talrijker en omvangrijker tumoren aangetroffen.

De resultaten van de laatste 3 beschreven experimenten worden samengevat in tabel VIII.

Tabel VIII.

De invloed van de combinatie oestrogenen en progesteron op de ontwikkeling van het chemisch verwekte cervico-vaginale carcinoom.

nr. exp.	wk.	o/w	p/w	A	a	b	c	d	e	f	x	xx	xxx
VIII.	2			10	4	6							
	6	1	1	10			1	2	5	2	2		
	10			12			1	5	1	5	4		1
IX.	2			10	7	3							
	6	1	10	10			3	4	1	2	1	1	
	10			11			4	2	2	3	1	1	1
X.	2			10	1	9							
	6	15	10	12			1	1	1	9	2	5	2
	10			9				1	2	6		1	5

Zie voor de verklaring der tekens naar het onderschrift van tabel VI (blz. 76) en VII (blz. 77).

Uit de besproken experimenten komt duidelijk naar voren dat oestrogenen alleen of in combinatie met progesteron het groeiproces,

dat aan de gang gezet was door de 1 % oplossing van 20-methylcholanthreen in chloroform tezamen met de geslachtshormonen, tot carcinoom kunnen voltooien. De mogelijkheid, dat de weefselveranderingen, die gekenmerkt waren door afdruppeling van epitheelcellen in stroma (vgl. fig. 17) spontaan zouden overgaan tot carcinoom was echter nog niet uitgesloten.

Een aantal van 20 muizen werd één week na een dubbelzijdige ovariectomie gedurende 14 dagen zesmaal gepenseeld op de portio uteri met een 1 % oplossing van 20-methylcholanthreen in chloroform. Tweemaal per week kregen deze muizen in deze periode van 2 weken 2,5 μ g oestradiol-17 β monobenzoaat toegediend. Zoals uit experiment III (blz. 76) gebleken was, moeten zich na 14 dagen duidelijke weefselveranderingen voorgedaan hebben, voor een deel gekenmerkt door het afdruppelen van epitheelcellen in een nieuwgevormd tumorbed (zie fig. 17). In tegenstelling tot experiment III werd nu echter de toediening van oestrogenen gestaakt en na 6 resp. 10 weken werd, gerekend vanaf de eerste penseling, een groep van 10 muizen opgeofferd. Het epitheel was gemiddeld 3 à 4 cellagen dik en toonde geen duidelijke celdelingsactiviteit. De epitheelafwijkingen, die na 14 dagen ontstaan moeten zijn, leken voor een groot deel gestabiliseerd. Behalve dat de epitheelcellen met elkaar contact hadden gekregen waren geen opmerkelijke veranderingen te zien. Het stroma bestond uit fibreus bindweefsel. De meest ernstige waargenomen slijmvliesafwijking wordt afgebeeld in fig. 43.

Vervolgens werd een experiment uitgevoerd om na te gaan wat de invloed was van oestrogenen op deze min of meer gestabiliseerde veranderingen van het slijmvlies. Een twaalfstal muizen werd één week na castratie behandeld met oestradiol-17 β monobenzoaat (tweemaal per week 0,5 μ g), terwijl de portio uteri driemaal per week gepenseeld werd met een 1 % oplossing van 20-methylcholanthreen in chloroform. Na twee weken werd deze behandeling gestaakt. Na een 6 weken durende rustperiode werd weer tweemaal per week gedurende 8 weken 0,5 μ g oestradiol-17 β monobenzoaat subcutaan toegediend. Bij één van de twaalf muizen had zich een carcinoom ontwikkeld. Bij de overige muizen toonde het slijmvlies alleen matige dysplastische afwijkingen met in de omgeving behalve lymfocyten ook plasmacellen. Deze dysplastische veranderingen waren minder ernstig dan in de groep muizen uit experiment II (vgl.

tabel VI, blz. 76), die na 10 weken opgeofferd werden. Het is daarom mogelijk dat gedurende de rustperiode van 6 weken de gevoeligheid van het proces voor oestrogenen afgenomen is.

E. CONCLUSIES

Uit de experimenten zijn enige conclusies te trekken. De hoogte van het epitheel gedurende de eerste penseling van de portio uteri kan onder bepaalde omstandigheden van belang zijn voor de snelheid van de ontwikkeling van het cervico-vaginale carcinoom. Waarschijnlijk is de concentratie van kankerverwekkende stoffen in de omgeving van het stratum basale van grote betekenis. Het is voorstelbaar dat een brede, verhoornde epitheellaag een zekere bescherming biedt.

Het werd duidelijk dat de combinatie oestrogenen en chloroform verantwoordelijk was voor de slijmvliesveranderingen, die gekenmerkt waren door afdruppeling van epitheelcellen in een nieuw gevormd tumorbed (tabel III, blz. 71). De mogelijkheid bestaat zelfs dat 20-methylcholanthreen dit proces vertraagt. Uit het enzym-histochemisch onderzoek, dat in hoofdstuk III besproken werd, bleek dat we hier nog niet kunnen spreken van carcinoom.

Een voortgezette behandeling van oestrogenen en chloroform liet zien dat deze combinatie ook in staat is om carcinoom te veroorzaken. Het werd wel waarschijnlijk dat 20-methylcholanthreen dit proces bevorderde (blz. 72). We kregen de indruk dat de snelheid van de ontwikkeling van het carcinoom afhankelijk was van de hoeveelheid toegediende oestrogenen (tabel VI, blz. 76).

De ontwikkeling van het proces op zichzelf was afhankelijk van de aanwezigheid van oestrogenen, want indien deze geslachtshormonen niet toegediend werden (tabel VI, blz. 76), deden zich geen slijmvliesveranderingen voor, die in verband gebracht konden worden met het carcinogenetische proces. Als gedurende de ontwikkeling van de weefselveranderingen de toediening van oestrogenen gestaakt werd trad een zekere stabilisatie op (blz. 79).

Dit proces, aan de gang gezet door de combinatie oestrogenen, 20-methylcholanthreen en chloroform, kan zeer wel voltooid worden door oestrogenen alléén, vooral als de behandeling direct voortgezet wordt.

Vergelijking van de resultaten uit experiment II en VIII, resp.

IV en X toonde dat progesteron in de gegeven doseringen geen invloed heeft uitgeoefend op de eerste slijmvliesafwijkingen. Rekening houdend met de toename van de ernst der slijmvliesveranderingen en het aantal en de grootte der tumoren in deze groepen lijkt het waarschijnlijk dat progesteron een synergistisch effect heeft op de bevorderende invloed, die oestrogenen uitoefenen op de ontwikkeling van dysplastische epitheelafwijkingen en de overgang naar tumoren bij geovariectomeerde muizen. Dit verschijnsel kwam het sterkst naar voren in de groep muizen, die met zeer hoge doses geslachtshormonen behandeld waren (tabel VI en VIII, blz. 76 en 78).

Hoewel we de indruk kregen dat progesteron ook invloed uitoefende op de differentiatie van de tumor in de richting van een mucoepidermoid carcinoom (fig. 45) was het aantal tumoren te gering om hieruit een betrouwbare conclusie te trekken.

Opvallend was dat de meeste slijmvliesafwijkingen gelokaliseerd waren aan de achterzijde van de vagina in de omgeving van het achterste gewelf (fig. 7). Voor het grootste deel is dit waarschijnlijk het gevolg van de toegepaste techniek hoewel de geringere hormonale gevoeligheid van het cervixepitheel zeker een rol gespeeld kan hebben. In het volgende en laatste hoofdstuk zullen de verkregen resultaten met literatuurgegevens beschouwd worden.

BESCHOUWING

Met behulp van gegevens uit de literatuur en de resultaten van ons onderzoek zal in dit hoofdstuk getracht worden een beeld te geven van de gecompliceerdheid van het kankerprobleem.

Aan iedere celdeling gaat een duplicering van de DNZ-moleculen in de kern vooraf. Genetici berekenden dat gedurende dit proces veel fouten mogelijk zijn (ORGEL, 1963). Geringe wijzigingen in de DNZ-keten van geslachtscellen kunnen de oorzaak zijn van b.v. enzymdeficienties, die in bepaalde organen tot uiting komen. Soma-tische mutaties zouden in ieder organisme in betrekkelijk grote hoeveelheden aanwezig kunnen zijn. De kans, dat het aantal veranderingen zo groot is, dat het leven van de cel er niet mee verenigbaar is, moet zeker aanwezig geacht worden aangezien de genetische eigenschappen in het DNZ verankerd liggen. Aan de andere kant behoeven mutaties in het DNZ niet tot uitdrukking te komen.

Mutaties van die delen van het DNZ, die een onderdeel vormen van het groei- en differentiatiemechanisme van de cel kunnen aanleiding geven tot tumorgroei. In hoofdstuk I wordt in figuur 3 (blz. 9) het intra- en intercellulaire regulatiemechanisme van de huid van de muis volgens BULLOUGH (1964) weergegeven. Hoewel de homoiostase in andere weefsels op verschillende manieren onderhouden wordt veronderstelden BULLOUGH en RYTÖMAA (1965), dat het basispatroon van de diverse regulatiemechanismen gelijk zal zijn. Veranderingen van het DNZ kunnen op verschillende manieren aanleiding geven tot stoornissen van dit mechanisme. Zo kunnen repressoren, waarvan de structuur bepaald wordt door een gedeelte van de DNZ-keten, waarin een mutatie plaats vond, dusdanig gewijzigd worden dat het optimaal uitoefenen van hun functie niet meer mogelijk is. Het is eveneens voorstelbaar, dat een productie van abnormale chalonon plaats vindt met een gedeeltelijk of totaal verlies van activiteit.

Indien deze veranderingen een verschuiving veroorzaken in het evenwicht tussen het aantal ongedifferentieerde en gedifferentieerde cellen ten gunste van de eerstgenoemde cellen dan leidt dit tot tumorgroei.

Er zijn ook onderzoekers, die de aandacht vestigen op stoornissen van de plasmagenen. Dit zijn in het cytoplasma voorkomende deeltjes, die onafhankelijk van het DNZ erfelijke eigenschappen zouden bezitten. Bij iedere celdeling zou er een verdubbeling plaats vinden van deze veronderstelde structuren. Het is niet uitgesloten dat ook deze plasmagenen betrokken zijn bij het groei- en differentiatiemechanisme van de cel. Beschadiging van deze plasmagenen zou dus theoretisch gezien ook gevolgd kunnen worden door tumorgroei (NOTHDRUFT, 1948).

Indien het juist is dat zich spontaan mutaties in de cellen voordoen dan wordt het organisme voortdurend bedreigd door zich ontwikkelende tumoren. Een steun voor deze gedachtengang is dat in weefselkweken cellen kunnen ontstaan, die na transplantatie tot tumoren uitgroeien (LEVAN en BIESELE, 1958; POEL, 1964; SANFORD, 1965). Aangezien deze processen in het algemeen niet tot ontwikkeling komen, mag verondersteld worden dat het lichaam over verdedigingsmechanismen beschikt om de ontspoorde cellen te elimineren. BURNET (1964) opperde de mogelijkheid dat de „homograft” immuniteit hier zijn betekenis aan kan ontleen. Waarschijnlijk zijn locale en algemene afweermechanismen aanwezig, die afhankelijk van bepaalde omstandigheden in werking zullen komen. We zullen deze gedachtengang als uitgangspunt gebruiken om enige facetten van de carcinogenese te bespreken.

Iedere verschuiving in het evenwicht tussen de ontspoorde cellen en het organisme ten gunste van de gemuteerde cellen kan aanleiding geven tot de ontwikkeling van een gezwel. Er zijn verschillende mogelijkheden waardoor een tumor kan ontstaan.

1. *Toename van het aantal mutaties*

a. Indien het aantal celdelingen toeneemt zal het aantal spontane mutaties toenemen. Het is voorstelbaar dat op een bepaald ogenblik zoveel ontspoorde cellen ontstaan zijn dat het verdedigingsmechanisme tekort schiet. Stoffen, die de celdelingsactiviteit stimuleren, zouden na langdurige toediening op deze wijze carci-

noom kunnen veroorzaken. Dit zou een verklaring kunnen zijn voor de ontwikkeling van het cervixcarcinoom bij muizen na langdurige toediening van oestrogenen zoals door ALLEN en GARDNER (1941) waargenomen werd.

b. Kunstmatige verhoging van het aantal mutaties. Een groot deel der kankerverwekkende agentia bezitten waarschijnlijk deze eigenschap (DANNENBERG, 1963). BROOKES en LAWLEY (1964) hebben voor enige polycyclische koolwaterstoffen wel zeer aanneemelijk gemaakt, dat deze hun aangrijpingspunt vinden in het DNZ.

2. *Afname van de weerstand*

a. Ofschoon er weinig bekend is over de locale afweer moet worden aangenomen dat hier sprake is van een belangrijk verdedigingsmechanisme. ORR (1958) verdedigde de opvatting dat bij het chemisch verwekte huidcarcinoom de belangrijkste gebeurtenissen niet plaats vinden in het epitheel maar in het eronder gelegen bindweefsel. Niet alleen bevordert de aanwezigheid van jong bindweefsel het vermogen tot invasieve groei (VASILIEV, 1958), maar het kan ook de celdelingsactiviteit van het erboven gelegen epitheel stimuleren (MOTTEL en Mc COY, 1964). Fibrosering van bindweefsel werd vooral gevonden om in regressie gaande tumoren (MALTONI en ZAJDELA, 1963). Het is niet uitgesloten, dat de basale membraan, die op het grensvlak van bepaalde weefselstructuren voorkomt, een mechanische barrière tussen de betreffende weefsels vormt.

b. Evenals over de locale afweer zijn betrekkelijk weinig exacte gegevens bekend over de algemene weerstand. Veel onderzoeken werden en worden verricht om een nader inzicht te krijgen in de rol, die het immunologisch apparaat speelt gedurende de carcinogenese. Tijdens dit proces immers heeft een verschuiving plaats van het antigene spectrum van de zich ontwikkelende tumorcellen (HADDOW, 1965). HILLEMANS (1964) toonde dit verschijnsel aan bij het menselijke portiocarcinoom. Aanvankelijk verdwenen orgaan-specifieke antigenen, terwijl gedurende het infiltratieve stadium een tumorspecifiek antigeen gevormd werd. Ook in andere menselijke tumoren kan een overeenkomstige verschuiving waargenomen worden (TEE o.a., 1964). Het is niet bekend of dit antigeen bij de draagster antilichamen kan opwekken. Uit de experimentele cancerologie zijn enkele voorbeelden bekend waaruit blijkt dat bepaalde tumo-

ren resistentie bij het dragende organisme kunnen veroorzaken. Dit werd aangetoond voor chemisch verwekte tumoren, terwijl bij muizen die geïnoculeerd waren met het polyoma virus een polyoma tumor na transplantatie niet aanslaat (BURNET, 1964).

De thymus als onderdeel van het immunologische apparaat kan onder bepaalde omstandigheden ook een rol spelen. LAW (1965) vond dat muizen die direct na de geboorte thymectomie ondergaan hadden opvallend gevoeliger geworden waren voor de ontwikkeling van speekselkliertumoren, die door het polyoma virus geïnduceerd worden. Interessant zijn ook de waarnemingen van MILLER e.a. (1963), die bij pasgeboren muizen thymectomie verrichtten. Het bleek dat chemisch verwekte huidtumoren bij deze proefdieren zich sneller ontwikkelden. De tumoren waren groter en gingen zelden spontaan terug. NISHIZUKA e.a. (1965) konden deze waarneming eveneens bij muizen met een chemisch verwekt levercarcinoom bevestigen. Van enige carcinogene stoffen is bekend, dat deze het immunologische apparaat kunnen beschadigen (BERENBAUM, 1964). MAISIN (1964) toonde aan dat in de thymus een tumorremmende stof geproduceerd wordt en veronderstelde dat de thymus het door de carcinogenen beschadigde immunologische apparaat kan herstellen, waardoor bepaalde ontwikkelende tumorcellen herkend kunnen worden.

Indien het reticulo-endotheliale systeem aspecifiek geprikkeld wordt met mycobacteriën kan de ontwikkeling van geënte maligne tumoren geremd worden (HALPERN, 1964). Ook als de tumor reeds ontwikkeld is blijkt het verdedigingsmechanisme nog een belangrijke rol te kunnen spelen. Zo kan totale lichaamsbestraling gevolgd worden door een stijging van het aantal metastasen (FELDMAN en YAFFE, 1959).

3. Combinaties van de onder 1 en 2 genoemde factoren

Waarschijnlijk zullen vrijwel alle gezwellen veroorzaakt worden door een combinatie van factoren. Indien tegelijkertijd met een stof, die de celdelingsactiviteit stimuleert een mutageen agens toegevoegd wordt bestaat de kans dat snel tumoren ontstaan. De desoxyribonucleïnezuren zouden gedurende het verdubbelingsproces extra gevoelig zijn voor de schadelijke inwerking van bepaalde stoffen (DANNENBERG, 1963). Deze opvatting zou voor een deel de bevorderende werking van oestrogenen op een chemisch verwekt tumorproces

verklaren, zoals door enige onderzoekers en door ons is vastgesteld. Mutagene agentia behoeven op zichzelf geen carcinogene werking te hebben (TRAININ e.a., 1964). Alleen als een mutatie groei- en differentiatiestoornissen ten gevolge heeft bestaat de kans dat er tumoren ontstaan. Deze kans wordt groter, indien een dergelijk agens tevens de weerstand verzwakt.

Het is waarschijnlijk, zoals in hoofdstuk I reeds is uiteengezet, dat een gezwel gedurende zijn bestaan in meerdere of mindere mate altijd afhankelijk blijft van zijn gastheer. De autonomie van kwaadaardige tumoren is waarschijnlijk minder groot dan men verondersteld heeft (WOODRUFF, 1964).

Initiatie is het proces, dat ontstaat in weefsel na contact met bepaalde carcinogenen. Waarschijnlijk stijgt dan het aantal mutaties. Het is evenwel ook mogelijk dat de belangrijkste gebeurtenissen in het onder het epitheel gelegen bindweefsel plaats vinden (ORR, 1958). De locale weerstand eventueel tezamen met de algemene weerstand kan dusdanig afgenomen zijn, dat het aantal spontaan ontspoorde cellen voldoende is om op de duur carcinoom te veroorzaken. Ook een combinatie van beide factoren komt vanuit theoretisch oogpunt in aanmerking. Initiatie behoeft zeker niet direct gevolgd te worden door tumorgroei. De initiatie kan versterkt worden door de zgn. *co-carcinogenen*, die de cel gevoeliger kunnen maken voor de inwerking van mutagenen. Een vrij lange *latente periode* kan volgen, die o.a. afhankelijk is van de celdelingsactiviteit. Gedurende de latente periode kunnen allerlei factoren het proces beïnvloeden. Mutagenen kunnen een bevorderende invloed uitoefenen door toename van het aantal mutaties. Zo blijken vele koolwaterstoffen naast carcinogene ook promotie-bevorderende eigenschappen te bezitten. Agentia, die de celdeling aanzetten kunnen deze periode verkorten. Vorming van een tumorbed, dat bestaat uit jonge bindweefselcellen heeft duidelijk een bevorderende werking. De invloed op de promotie van crotonolie kan hierdoor voor een deel verklaard worden. Cortison remt dit proces zoals door SELEYE (1957) aangetoond werd. Een deficiëntie van bijnierschors hormonen daarentegen bevordert de promotie (TRAININ, 1963).

Het is gebleken dat initiatie en promotie niet scherp van elkaar af te grenzen zijn. Zo heeft men aangetoond dat crotonolie ook

een carcinogene werking kan ontplooiën (ROE, 1956; BOUTWELL e.a., 1957).

Indien eenmaal een gezwel ontstaan is speelt het plaatselijk evenwicht tussen tumor en stroma waarschijnlijk een belangrijke rol. FOULDS (1949) heeft vastgesteld dat *progressie* in diverse aanwezige tumoren zich onafhankelijk kan ontwikkelen. Waarschijnlijk geldt dit zelfs voor verschillende delen van één en dezelfde tumor. Zo vonden wij om sommige tumorveldjes een goed gevormde basale membraan, om andere echter niet. Het is zeer wel mogelijk dat deze basale membranen door de tumorcellen gevormd worden (PIERCE, 1965).

Terwijl enkele delen van een tumor in een tijdelijk gestabiliseerd evenwicht kunnen zijn met de gastheer kan het evenwicht elders verbroken zijn. Mogelijk is het wisselende enzympatroon van de door ons onderzochte tumoren daar een uitdrukking van.

De beslissing of een stof wel of niet carcinogeen is wordt gewoonlijk gebaseerd op eindresultaten d.w.z. men bepaalt hoeveel tumoren gedurende een zeker aantal experimenten ontstaan, hoe snel deze zich ontwikkelen en in hoeverre de overlevingsduur van het dier beïnvloed wordt. Een gezwel is evenwel het eindresultaat van een meestal langdurig en ingewikkeld proces, dat door talloze factoren beïnvloed kan worden.

Aan de hand van het zich ontwikkelende cervico-vaginale carcinoom bij de muis kan dit worden gedemonstreerd. Oestrogenen kunnen geen initiatie veroorzaken, maar ze kunnen zeer wel als co-carcinogenen werkzaam zijn (VON HAAM en ALBERTY, 1960). Ze kunnen de omstandigheden gunstiger maken voor de inwerking van mutagenen. MURPHY (1961) toonde aan dat de tumorbevorderende werking van oestrogenen niet alleen veroorzaakt wordt door het stimulerende effect op de celdelingsactiviteit. Verhoging van een hoeveelheid oestrogenen, die niet gepaard gaat met een stijging van het aantal celdelingen wordt toch gevolgd door een beduidende toename van het aantal carcinomen. In onze experimenten kwam naar voren dat oestrogenen in combinatie met chloroform een bevorderende invloed uitoefenen op de carcinogenese. Het morfologisch substraat bestond voor een deel uit de vorming van een gunstig tumorbed dus door afname van de locale weerstand. Oestrogenen bleken dus promotie-bevorderende stoffen te zijn. De ont-

wikkeling van carcinoom uit dysplastisch epitheel was ook afhankelijk van de aanwezigheid van oestrogenen. Indien namelijk na de eerste slijmvliesafwijkingen de toediening van oestrogenen gestaakt werd ontstond geen carcinoom. Deze promotie-bevorderende werking van oestrogenen had dus betrekking op een ander onderdeel van het proces dan op de reeds eerder besproken fase. Het is voorstelbaar dat oestrogenen ook nog op andere manieren de carcinogenese kunnen bevorderen. Onder invloed van oestrogenen wordt de inhoud van de uterus snel geïnfecteerd met bacteriën (WEINSTEIN e.a. 1943). MENKIN (1960) toonde een bevorderende werking aan van ontstekingssexsudaat op de carcinogenese. Het zou dus mogelijk zijn dat oestrogenen ook op deze wijze het tumorproces stimuleren. MURPHY (1961) heeft deze hypothese niet kunnen bevestigen. In hoeverre een zich ontwikkelende tumor afhankelijk is van oestrogenen werd door THIERY (1962) nagegaan, die enige tijd vóór de obductie een grote hoeveelheid oestrogenen inspoot bij tumor dragende dieren. Afwijkingen van het enzympatroon nam hij niet waar.

PALETTA en MAX (1942) toonden de bevorderende werking aan van oestrogenen op het chemisch verwekte huidcarcinoom. GILMOUR (1937) had dit verschijnsel reeds ontdekt en waargenomen dat tumorcellen niet meer beïnvloed kunnen worden door oestrogenen.

Ook andere voorbeelden zijn in de experimentele pathologie bekend, waaruit blijkt dat door progressie hormoonafhankelijke kankercellen hun afhankelijkheid verliezen. Hoe dat gebeurt is een onopgelost vraagstuk.

De ontwikkeling van het cervico-vaginale carcinoom kan beïnvloed worden door progesteron als oestrogene stoffen aanwezig zijn.

Uit ons experiment (tabel VII, blz. 77) werd duidelijk, dat onder de gegeven omstandigheden progesteron op zichzelf geen invloed uitoefent op de ontwikkeling van het cervico-vaginale carcinoom.

Indien met oestrogenen vergelijkbare doseringen werden gebruikt zagen we geen duidelijke invloed op de beginnende afwijkingen. De overgang van dysplastisch epitheel naar carcinoom werd evenwel vooral na hogere doseringen, bevorderd, zodat we hier een synergie tussen progesteron en oestrogenen waarnamen (tabel VI en VIII, blz. 76 en 78). Indien de dosering ten opzichte van de hoeveel-

heid oestrogenen sterk verhoogd werd, was een antagonistisch effect op de beginnende slijmvliesafwijkingen niet uit te sluiten.

Het is bekend dat progesteron in combinatie met oestrogenen een bevorderende invloed kan uitoefenen op het chemisch verwekte mammacarcinoom (JULL, 1954). RANADIVE e.a. (1960) konden bij muizen, die in een staat van pseudo-zwangerschap gebracht waren meer mammacarcinomen opwekken dan bij normale muizen. Ook uit deze waarneming is een promotie-bevorderende invloed van progesteron af te leiden.

Al kregen we de indruk dat progesteron de differentiatie van een tumor beïnvloedt, zoals door FRIEDMAN (1964) bij ratten aangetoond werd, toch konden we dit verschijnsel niet bevestigen bij gebrek aan een voldoende hoeveelheid tumoren in de bestudeerde groepen. Voorts is gebleken dat chloroform vooral tijdens het begin van het proces een belangrijke rol in combinatie met de toegediende oestrogenen gespeeld heeft. Opvallend was de remmende werking van 20-methylcholanthreen gedurende dit stadium (tabel III). Hoewel het waarschijnlijk is dat deze polycyclische koolwaterstofverbinding reeds vanaf het begin werkzaam is geweest, bleek de invloed pas toen het proces reeds gevorderd was.

Uit deze bespreking volgt dat het mechanisme van de werking van een tumorbevorderende of remmende stof waarschijnlijk van stadium tot stadium kan wisselen. Tevens bestaat de mogelijkheid, dat een of andere stof op zekere onderdelen van het carcinogenetische proces een bevorderende werking ontplooit en op andere delen een remmend effect heeft. Steeds zal men voor ogen moeten houden dat een bepaald verschijnsel het gevolg is van de inwerking van een aantal factoren.

Het ontrafelen van de verschillende mechanismen, die hier een rol spelen, behoort tot een der meest wezenlijke vraagstukken, die de kankeronderzoekers zich opgelegd hebben.

Vooropgesteld dat nimmer verschijnselen uit het dierenrijk zonder meer vergeleken kunnen worden met die, welke zich bij de mens voordoen, is het nuttig de experimenteel verkregen kennis te toetsen aan de bij de mensen gedane waarnemingen.

Hoewel het cervico-vaginale epitheel van de muis in velerlei opzicht van de overeenkomstige menselijke weefselstructuren verschilt blijken het organen te zijn, die wat betreft hun vorm een functie afhankelijk zijn van de aanwezigheid van hormonen.

Meerdere factoren, die van belang zouden kunnen zijn bij het ontstaan van het cervix carcinoom bij de vrouw worden in de literatuur genoemd. Smegma, trauma, chronische irritatie en mogelijk contraceptiva en ejaculaat lijken een belangrijke rol te kunnen spelen. Het vroege huwelijk, zwangerschap, ras, erfelijkheid en hormonale stoornissen zouden eveneens in verband te brengen zijn met het ontstaan van portiocarcinoom. Aan het smegma wordt een belangrijke plaats in de genoemde reeks van factoren toegekend (BOYD en DOLL, 1964). Aangezien in het dierenrijk portiocarcinoom zeer zelden voorkomt is het waarschijnlijk dat de levensgewoonten van de mens van doorslaggevende betekenis zijn.

Opvallend is het verschijnsel dat peniscarcinoom bij hengsten nogal eens ontstaat, hetgeen in verband gebracht kan worden met het aanwezige smegma (COTCHIN, 1964). Dit smegma blijkt namelijk getest op de huid van de muis carcinogene eigenschappen te bezitten (PLAUT en KOHN-SPEYER, 1947). Dat bij merries slechts bij hoge uitzondering cervixcarcinoom voorkomt kan voor een deel geweten worden aan de geringe cohabitatiefrequentie.

Door meerdere auteurs is aangetoond dat menselijk smegma een zwak carcinogeen agens is (PRATT-THOMAS e.a. 1956; HEINE e.a. 1958). Aangezien carcinomen zich meestal ontwikkelen onder invloed van een combinatie van factoren zal het smegma alleen niet verantwoordelijk gesteld kunnen worden. Tot deze conclusie komt ook de auteur (1965) van een „Leading article” in de „Lancet” dat handelt over de oorzaken van het cervixcarcinoom.

De laatste jaren zijn enige onderzoeken verricht waaruit blijkt dat hormonale stoornissen ook bij de mens van belang kunnen zijn. Zo vonden KUGA e.a. (1962) dat bij gecasteerde vrouwen het cervixcarcinoom 10 jaar eerder ontstond. NIEBURGHs (1951) en SHE e.a. (1963) legden de nadruk op een gestoorde ovariële functie, die een rol zou kunnen spelen bij de ontwikkeling van het cervixcarcinoom bij de vrouw. De verkregen gegevens zijn evenwel te gering om er concrete conclusies uit te trekken.

Het lijkt van groot belang te zijn klinisch na te gaan of hormonale stoornissen van invloed zijn op de ontwikkeling van het portiocarcinoom. Aangezien de laatste jaren het gebruik van ovulatieremmende middelen toeneemt wordt dit probleem steeds urgenter. Deze orale contra-conceptiva bestaan namelijk uit een combinatie

van oestradiol- en oestron- of progesteronderivaten. Over de invloed van deze stoffen op het portio carcinoom bij de vrouw zijn nog geen bruikbare gegevens bekend. De reden hiervan is dat de duur van de ontwikkeling van het carcinoom zeer lang kan zijn. Het is waarschijnlijk, dat de tijd, die benodigd is voor de ontwikkeling van een infiltrerend carcinoom 15 tot 20 jaar kan bedragen (NOVAK en NOVAK, 1958). Een observatieperiode van ongeveer 10 jaar lijkt noodzakelijk om een eventuele invloed van de orale ovulatie-remmende middelen op dit proces met enige zekerheid vast te kunnen stellen.

De taak van de experimentele kankeronderzoeker zal moeten bestaan uit het ontwerpen van proefopstellingen, waarin de klinische kennis omtrent dit probleem zo goed mogelijk tot zijn recht komt. Hoe dichter de kliniek en het laboratorium elkaar zullen benaderen des te sneller zullen resultaten geboekt worden voor de patient, waarvoor allen, die de geneeskunde beoefenen zich inzetten.

SAMENVATTING

Het ontstaan van een gezwel kan opgevat worden als een uiting van een gestoord evenwicht tussen een aantal ontspoorde cellen en het organisme.

In hoofdstuk I worden intra- en intercellulaire regulatiemechanismen besproken, die verantwoordelijk zijn voor de homoiostase in weefsels. In dit verband speelt het immunologische apparaat waarschijnlijk ook een belangrijke rol. Stoornissen van deze mechanismen kunnen aanleiding geven tot tumorgroei.

Er heerst nog steeds geen eenstemmigheid over de vraag waar het primaire aangrijpingspunt van kankerverwekkende stoffen gelegen is: in het cytoplasma of in de kern. Het lijkt waarschijnlijk dat een mutatie of een reeks van mutaties verantwoordelijk zijn voor de essentiële veranderingen die gedurende de carcinogenese in de cel plaats vinden. Het is zeker niet uitgesloten dat kankerverwekkende stoffen afweermechanismen kunnen beschadigen.

In verband met stoornissen in het grensgebied tussen verschillende weefselsoorten, die bij gezwelvorming een grote rol spelen, wordt vooral aandacht geschonken aan enige histologische bijzonderheden van het grensgebied tussen epitheel en bindweefsel.

Aan de hand van een denkbeeldig tumorproces worden begrippen uit de experimentele cancerologie toegelicht.

De verschijningsvorm van iedere tumor is uniek en weerspiegelt op ieder moment de mate van de evenwichtsstoornis, die bestaat tussen het organisme en het gezwel.

In hoofdstuk II wordt een literatuuroverzicht gegeven van het experimentele cervico-vaginale carcinoom. In dit verband wordt ook de anatomie en fysiologie van het cervico-vaginale gebied van de muis besproken. De anatomische structuur is sterk afhankelijk van de spiegel der geslachtshormonen.

Het is een onopgelost vraagstuk waar het primaire aangrijpings-

punt van deze hormonen in de cel gelegen is. De homeostase is in weefsels, die voor wat hun bouw en functie betreft afhankelijk zijn van de aanwezigheid van hormonen, bijzonder gecompliceerd.

In het dierenrijk komt het cervixcarcinoom zelden spontaan voor. Uit de literatuur blijkt dat met tal van agentia bij de muis een cervico-vaginaal carcinoom opgewekt kan worden. Waarschijnlijk versnellen oestrogenen bij geovariectomeerde muizen het kankerproces. Progesteron en androgenen zouden enigszins remmend kunnen werken. Via dysplastische veranderingen van het epitheel ontwikkelt zich op de duur een min of meer gedifferentieerd plaveiselcelcarcinoom. Het bestaan van een carcinoma in situ als overgangsfase bij de muis wordt door enige onderzoekers verdedigd, door anderen betwijfeld. Bij elektronenmicroscopisch onderzoek kunnen intramitochondriaal gelegen lichaampjes aangetroffen worden waarvan de betekenis onduidelijk is. Door DE ROM e.a. (1959) werden virusachtige partikels gevonden. Het glycogeengehalte van de tumoren weerspiegelt enigszins de differentiatiegraad. Het DNZ-gehalte is in tumorcellen gestegen. Van de enzymhistochemische veranderingen, die in kankercellen waargenomen zijn, is vooral de stijging van de activiteit van het enzym 5-nucléotidase opvallend (THIERY en WIL-LIGHAGEN, 1962).

Hoofdstuk III wordt gewijd aan een onderzoek om een antwoord te krijgen op de vraag of er ook morfologische aanwijzingen zijn, die de snellere ontwikkeling van het carcinoom bij de met oestrogenen behandelde, geovariectomeerde muizen zouden kunnen verklaren. Uit een inleidend experiment werd wel zeer waarschijnlijk dat ovariectomie ook onder de gegeven omstandigheden van groot belang was.

Vervolgens werden twee groepen C_3H -muizen in het experiment opgenomen. De muizen uit één groep werden één week vóór de eerste penseling geovariectomeerd; deze dieren kregen gedurende de gehele behandeling tweemaal per week $0,5 \mu\text{g}$ oestradiol- 17β monobenzoaat toegediend. Beide groepen muizen werden gedurende 9 weken drie-maal per week op de portio uteri gepenseeld met een 1 % oplossing van 20-methylcholanthreen in chloroform. Gerekend vanaf de eerste penseling werden groepjes muizen opgeofferd resp. na 1, 2, 4, 7, 10, 14, 18 en 23 weken. Histo- en enzymhistochemische reacties werden uitgevoerd om de veranderingen nader te karakteriseren.

Het carcinoom, dat in de groep der normale muizen ontstond, ont-

wikkelde zich op de wijze, zoals reeds door meerdere onderzoekers is beschreven. Het eerste carcinoom werd gevonden bij een muis 18 weken na de eerste penseling. In de gehele groep, die bestond uit 40 muizen, werden slechts 3 carcinomen aangetroffen. In de groep der met oestrogenen behandelde, geovariectomeerde muizen waren opvallende veranderingen te zien. Reeds na één week bleek de basale membraan doorbroken te zijn, waardoor zich epitheelcellen begaven naar een zone tussen het epitheel en het beschadigde bindweefsel. Dit nieuwgevormde gebied bleek een gunstig „bed” te zijn voor de afgedruppelde epitheelcellen. Dit „tumorbed” werd gevormd door jonge bindweefselcomponenten. Gedurende dit stadium was het enzympatroon van de afgedruppelde epitheelcellen gelijk aan dat van de cellen, die het dysplastische epitheel vormden. Na 4 weken had zich bij 3 van de 4 muizen een infiltrerend carcinoom ontwikkeld met een kenmerkend enzympatroon. Van de 32 muizen die gedurende de proefduur opgeofferd waren kregen 20 dieren één of meer carcinomen. Ondanks het feit dat na de negende week de penselingen op de portio uteri gestaakt waren bleken de tumoren zich verder ontwikkeld te hebben.

Om enkele tumorveldjes had zich een duidelijke PAS-positieve basale membraan gevormd. Het glycogeengehalte bleek binnen zekere grenzen een maat te zijn voor de differentiatiegraad van de tumoren.

Het enzympatroon toonde in één en dezelfde tumor soms grote verschillen. In het algemeen was de activiteit van de volgende enzymen min of meer gestegen: 5-nucleotidase, NADH-tetrazoliumreductase, melkzuurdehydrogenase, NADPH-tetrazoliumreductase, glucose-6-fosfaatdehydrogenase, barnsteenzuurdehydrogenase en aminopeptidase. Daling van de enzymactiviteit werd geconstateerd voor de volgende enzymen: alkalische fosfatase (soms evenwel gestegen activiteit), β -hydroxyboterzuurdehydrogenase en de indoxyl- en naftol AS-D esterasen. Het enzympatroon van de tumoren, die bij de met oestrogenen behandelde, geovariectomeerde muizen ontstaan waren, kwam overeen met het patroon, dat SCARPELLI en PEARSE (1958) en THIERY en WILLIGHAGEN (1964) vonden in tumoren, die opgewekt waren bij normale muizen met behulp van een ander carcinogeen, opgelost in een ander oplosmiddel. De geringe verschillen, die tussen de onderzoekers waargenomen zijn kunnen

zeker voor een deel verklaard worden door een verschil in differentiatiegraad der onderzochte tumoren.

Chemisch verwekte cervico-vaginale carcinomen bezitten dus onafhankelijk van de verschillende wijze van ontwikkeling, hetzelfde enzympatroon. Uit het eindproduct van een tumorproces kan men blijkbaar in het algemeen weinig of niets te weten komen van de factoren, die tijdens de ontwikkeling een rol gespeeld hebben.

In hoofdstuk IV worden meerdere experimenten beschreven, die tot doel hebben enige factoren na te gaan, die van invloed zouden kunnen zijn op de ontwikkeling van het cervico-vaginale carcinoom. De muizen, die geovariectomeerd waren, werden gedurende 2 weken slechts zesmaal gepenseeld op de portio uteri door middel van een otoscoop. De duur van de meeste experimenten was niet langer dan 10 weken. De hoogte van het epitheel, gedurende de eerste penseling kan van belang zijn voor de snelheid van het carcinogenetische proces. Bij geovariectomeerde muizen is de combinatie van oestrogenen en chloroform verantwoordelijk voor de eerste slijmvliesveranderingen. Het is zeer wel mogelijk dat 20-methylcholanthreen dit proces remt. Zonder 20-methylcholanthreen kan onder invloed van oestrogenen en chloroform zich een carcinoom ontwikkelen. Zonder de hulp van oestrogenen kan de combinatie 20-methylcholanthreen opgelost in chloroform onder de gegeven experimentele omstandigheden geen carcinoom veroorzaken. Oestrogenen zijn niet alleen nodig voor de afdruppeling der epitheelcellen in een gevormd „tumorbed” maar ook voor de overgang dysplastisch epitheel naar carcinoom. Indien tussen beide stadia een rustpauze ingelast is, blijken oestrogenen aan invloed op deze overgangsfase ingeboet te hebben. Er moeten dus nog andere agentia aanwezig zijn wil tumorgroei onder invloed van oestrogenen tot ontwikkeling komen.

Rekening houdend met de toename van de ernst der slijmvliesveranderingen, het aantal en de grootte der tumoren lijkt het waarschijnlijk dat progesteron een synergistisch effect heeft op de bevorderende invloed, die oestrogenen uitoefenen op de ontwikkeling van dysplastische epitheel en de overgang naar tumor bij geovariectomeerde muizen.

In het laatste hoofdstuk worden de literatuurgegevens tezamen met de uit de eigen experimenten verkregen resultaten beschouwd.

Een hypothese over de carcinogenese wordt opgesteld. Uitgaande van de door de genetici berekende kans, dat gedurende iedere kern-deling vrij veel veranderingen in het DNZ kunnen ontstaan wordt gesteld, dat gedurende het leven voortdurend cellen gevormd kunnen worden, die losgekoppeld zijn van de bestaande regulatiemechanismen. Bij ontbreken van een mechanisme om deze gemuteerde cellen te vernietigen zouden er voortdurend tumoren kunnen ontstaan. Er is dus waarschijnlijk een natuurlijk evenwicht tussen een aantal ontregelde cellen en het afweermechanisme van het organisme in de zin dat onder normale omstandigheden het verdedigingsmechanisme alle ontspoorde cellen elimineert. Zowel een stijging van het aantal spontaan optredende mutanten, eventueel kunstmatig verhoogd, als een daling van de weerstand kunnen aanleiding geven tot een verschuiving van het evenwicht, waardoor gezwellen gevormd worden. Het is voorstelbaar dat een bepaalde stof beide zijden van het evenwicht beïnvloedt.

Oestrogenen stimuleren de delingsactiviteit van bepaalde cellen zodat het begrijpelijk is dat het aantal gemuteerde cellen binnen een bepaald tijdsbestek kan stijgen. De kans op tumorgroei zal dan ook groter worden. Mogelijk is dit de verklaring voor het feit dat oestrogenen, die waarschijnlijk geen extra mutaties kunnen veroorzaken, op de lange duur tumoren kunnen verwekken. Indien tegelijkertijd mutagenen toegediend worden zal nog sneller tumorgroei optreden, hetgeen experimenteel bevestigd is. Hier spelen oestrogenen dus o.a. de rol van co-carcinogenen. Uit ons onderzoek komt naar voren dat oestrogenen in combinatie met chloroform een gunstig „tumorbed”, dat bestaat uit basale membraansubstantie, jonge bloedvaten en fibroblasten, kunnen vormen. Behalve dit bevorderende effect op de carcinogenese blijken ze ook de overgang van dysplastisch epitheel naar carcinoom te versnellen. Verschillende fasen van het zich ontwikkelende cervico-vaginale carcinoom kunnen dus door oestrogenen bevorderd worden. De verklaring van het mogelijk aanwezige synergisme tussen oestrogenen en progesteron op het kankerproces blijft vooralsnog duister.

Er zijn enige publikaties waaruit blijkt dat progesteron ook een bevorderende invloed heeft op het chemisch verwekte mammacarcinoom.

Iedere stof die het veronderstelde evenwicht minder stabiel maakt kan een rol tijdens de carcinogenese spelen.

In verband met de uitkomsten van de verschillende onderzoeken worden factoren, die van invloed zijn op het ontstaan van carcinoom van de portio uteri bij de vrouw besproken. Aandacht moet worden besteed aan de mogelijkheid van een kankerbevorderende werking van orale ovulatie-remmende middelen.

SUMMARY

The development of a tumour can be taken as an expression of a disturbed equilibrium between some derailed cells and the organism.

Chapter I deals with the intra- and extracellular regulatory mechanisms which are responsible for the homeostasis in tissues. Disturbances of those mechanisms may cause development of a tumour and in this connection the immunological apparatus probably plays an important part.

There is still no consensus of opinion as to whether the cytoplasm or the nucleus of the cell is the primary site of action of carcinogens: probably a mutation or a series of mutations are responsible for the essential changes in the cell during carcinogenesis; and there seems to be a possibility that carcinogens can damage defence mechanisms.

In connection with disturbances in the borderline between tissues which are important in the development of a tumour, attention is paid to some histological peculiarities of the margins between epithelial and connective tissue. With the help of a hypothetical tumour process, conceptions from experimental cancerology are explained.

The appearance of each tumour is unique and reflects continuously some degree of disturbance in the equilibrium between the organism and the tumour.

In chapter II a review of the literature is given relevant to the chemically-induced cervicovaginal carcinoma. The anatomy and physiology of the cervix uteri and vagina of the mouse are also described. The anatomical structure is greatly dependent on the level of the sex hormones and the primary site of action of these hormones in the cell has not so far been found. Homeostasis in hormone-dependent tissues is extremely complicated.

In the animal kingdom carcinoma of the cervix uteri is rarely spontaneous. Several agents have been described that can induce a cervicovaginal carcinoma in mice. Oestrogens may accelerate the development of a tumour in ovariectomized mice. Progesterone and androgens may inhibit the carcinogenic process.

By way of dysplastic changes of the epithelium, a more or less differentiated epidermoid carcinoma gradually develops. Some authors defend and some doubt the existence of an intra-epithelial carcinoma as a phase in the development of an infiltrative carcinoma of the cervicovaginal epithelium.

Electron microscopic research has shown intramitochondrial corpuscles the significance of which is not clear. DE ROM et al (1959) found virus-like particles in the tumour.

Besides other enzyme histochemical changes the rise of the enzyme 5-nucleotidase is striking (THIERY and WILLIGHAGEN, 1962).

Chapter III describes an experiment to answer the question of whether there are any morphological indications to explain the enhanced development of the tumour process in the group of ovariectomized mice, treated with oestrogens. It became clear also under our experimental circumstances that ovariectomy is an important promoting factor. We took two groups of C₃H-mice. Mice of one group were ovariectomized one week before the first treatment of the portio uteri with 20-methylcholanthrene dissolved in chloroform (1 %). During the whole experiment twice a week 0.5 µg oestradiol-17β monobenzoate was injected.

All mice were painted (thrice a week) on the portio uteri till the tenth week. Following the first painting groups of mice were killed after respectively 1, 2, 4, 7, 10, 14, 18 and 23 weeks. Histo- and enzyme-histochemical reactions were performed to characterise the changes.

The development of the carcinoma in the group of normal mice was the same as already described by various authors. The first carcinoma was detected after 18 weeks. In the whole group of 40 mice we discovered only three carcinomas.

Striking changes were seen in the group of the oestrogen-treated, ovariectomized animals. Already after one week the basement membrane was broken up; epithelial cells dropped into a zone between the epithelium and the destroyed connective tissue. This newly for-

med "tumourbed" was composed of young components of connective tissue: fibroblasts, capillaries and inflammatory cells.

The enzyme pattern of these dropping epithelial cells was identical to the pattern of the dysplastic epithelium. After 4 weeks, 3 out of 4 mice had developed an infiltrating carcinoma with a characteristic enzyme pattern. Twenty mice of this group of 32 developed one or more tumours and tumours continued to develop despite the fact that the paintings were stopped after the ninth week. Around some parts of the tumour a PAS-positive basement membrane had been formed. The glycogen content was within certain limits a measure of the differentiation grade of the tumours.

The enzyme pattern sometimes greatly varied in one and the same tumour. Generally the activity of the following enzymes had increased: 5-nucleotidase, NADH-tetrazoliumreductase, lactic acid dehydrogenase, NADPH-tetrazoliumreductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, succinic acid dehydrogenase and aminopeptidase. Lowered enzymic activities were registered for the following enzymes: alkaline phosphatase (sometimes increased), β -hydroxybutyric acid dehydrogenase and nonspecific esterases.

The enzyme pattern of the tumours, which developed in the oestrogen-treated, ovariectomized mice corresponded with the pattern SCARPELLI and PEARSE (1958) and THIERY and WILLIGHAGEN (1964) found in tumours which were provoked in normal mice with the aid of another carcinogen, solved in another solvent. The minor differences observed by the authors can be partly explained through variation in the degree of differentiation of the tumours under investigation.

Chemically induced cervicovaginal carcinomas have the same enzyme pattern independent of the different ways of development. It does not seem possible to obtain information from the final product of a tumour process about factors which may be important during its development.

In chapter IV experiments are described for the study of some factors, which might influence the development of the cervicovaginal carcinoma. Ovariectomized mice were painted during 2 weeks six times on the portio uteri with aid of an otoscope. Most experiments did not exceed 10 weeks. The height of the epithelium at the time of first painting may be important for the rapidity of the carcinogenic process.

In ovariectomized mice, the combination of oestrogens and chloroform is responsible for the first changes of the mucous membrane. It is quite possible that this process is inhibited by 20-methylcholanthrene. Without 20-methylcholanthrene, oestrogens and chloroform may induce carcinoma but without the aid of oestrogens, the combination 20-methylcholanthrene, solved in chloroform cannot induce carcinoma under the described experimental circumstances. Oestrogens are necessary not only for the dropping of the epithelial cells in a formed "tumourbed" but also for the change dysplasia to carcinoma. If there is a pause between these two phases, the influence of oestrogens in this period is diminished. Other agents are also necessary if a tumour is to develop under the influence of oestrogens.

Taking into account the increase in the gravity of the changes in the mucous membranes and the number and the size of the tumours, it seems probable that progesterone has a synergistic effect on the promoting influence exercised by oestrogens on the development of the dysplastic epithelial and subsequently tumours in ovariectomized mice.

The last chapter discusses data from literature together with the results of our experiments. A hypothesis about the carcinogenesis is given. Genetics have shown that during every mitosis a great many changes may develop in the DNA. Therefore it may be assumed that during life cells are formed independent of the existing regulatory mechanisms. In the absence of mechanisms to destroy those mutants the organism would continuously be threatened by the development of tumours. Probably there is a natural equilibrium between a number of deranged cells and the defense mechanisms of the organism in this sense that under normal circumstances the defense mechanisms eliminate all deranged cells. A rise in the number of spontaneous mutants, and also of mutants created artificially, as well as a lowering of the resistance, can elicit a tumour. It is conceivable that a certain agent may influence both sides of the equilibrium.

Oestrogens stimulate the activity of mitosis of certain cells. It is comprehensible that the number of mutants may increase within a certain period and thus the opportunity for the development of a tumour will increase proportionately. This possibly explains the fact that oestrogens, although they probably cannot cause extra

mutations, can in course of time induce tumours; and if at the same time mutagens are given the tumour will develop faster, as has been confirmed experimentally. In those circumstances oestrogens act as co-carcinogens. We have demonstrated experimentally that oestrogens combined with chloroform form a favourable "tumourbed" consisting of basement membrane substance, young vessels and fibroblasts. Besides this promoting effect on carcinogenesis oestrogens enhance the change of dysplasia to carcinoma. Different phases of the developing cervicovaginal carcinoma can be promoted by oestrogens.

The explanation of the possible existing synergism between oestrogens and progesterone on carcinogenesis is still obscure.

It is a well-known fact that progesterone has a promoting influence on the chemically induced mammary carcinoma.

Every agent which renders the supposed equilibrium unstable can play a part during carcinogenesis.

In connection with the results of the experiments, factors concerning the development of the carcinoma of the portio uteri of woman are discussed.

Attention should be paid to the possibility of a carcinogenic effect of oral ovulation inhibitors.

FOTO'S

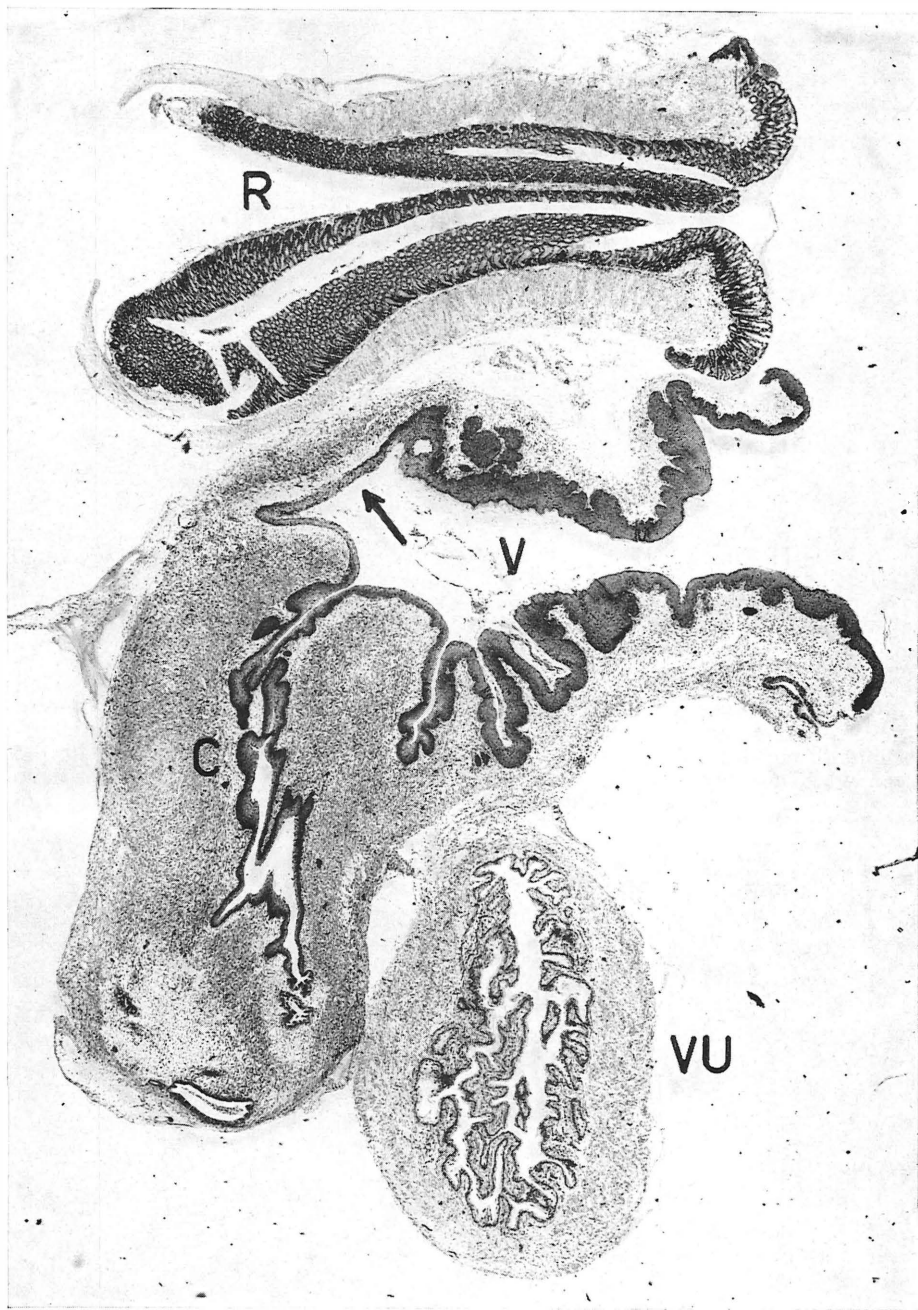


Fig. 7

Paraffinecoupe. HE-kleuring. Vergroting $7\frac{1}{2}$ x. Gedurende 2 weken werd de portio uteri van een geovariectomeerde C_3H -muis gepenseeld met een 1% oplossing van 20-methylcholanthreen in chloroform. Tegelijkertijd werd in deze tijd tweemaal per week $0,5 \mu g$ oestradiol- 17β monobenzoaat en 0,5 mg progesteron subcutaan ingespoten. De epitheel- en bindweefselveranderingen bevinden zich in de omgeving van het achterste gewelf (pijlte).

R = rectum; V = vagina; C = cervix; V.U. = vesica urinaria.



Fig. 8

Cryostaatcoupe. HE-kleuring. Vergroting 200 x. De foto's 8 tot en met 11 geven de ontwikkeling weer van het carcinoom bij muizen, die gedurende 9 weken gepenseeld werden op de portio uteri met een 1% oplossing van 20-methyl-cholanthreen in chloroform. In fig. 8 worden de veranderingen afgebeeld, die één week na de eerste penseling ontstonden. Het epitheel toont regeneratieve en het stroma degeneratieve veranderingen.

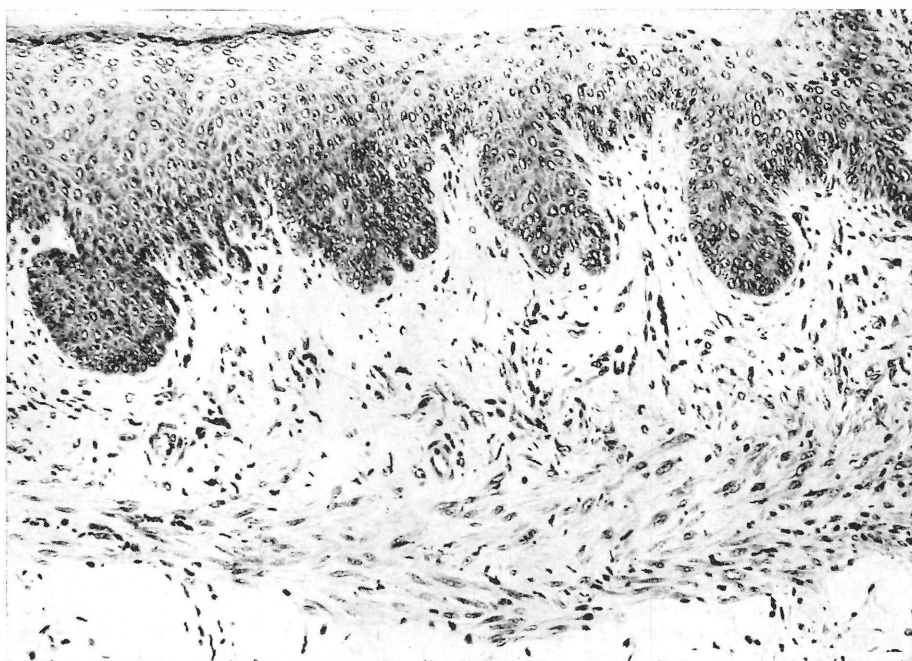


Fig. 9

Cryostaatcoupe. HE-kleuring. Vergroting 200 x. Zeven weken na de eerste penseling was een duidelijke basaalcelhyperplasie waarneembaar. Grotere en kleinere epitheelpapillen wisselen elkaar af. Zie ook het onderschrift van fig. 8.

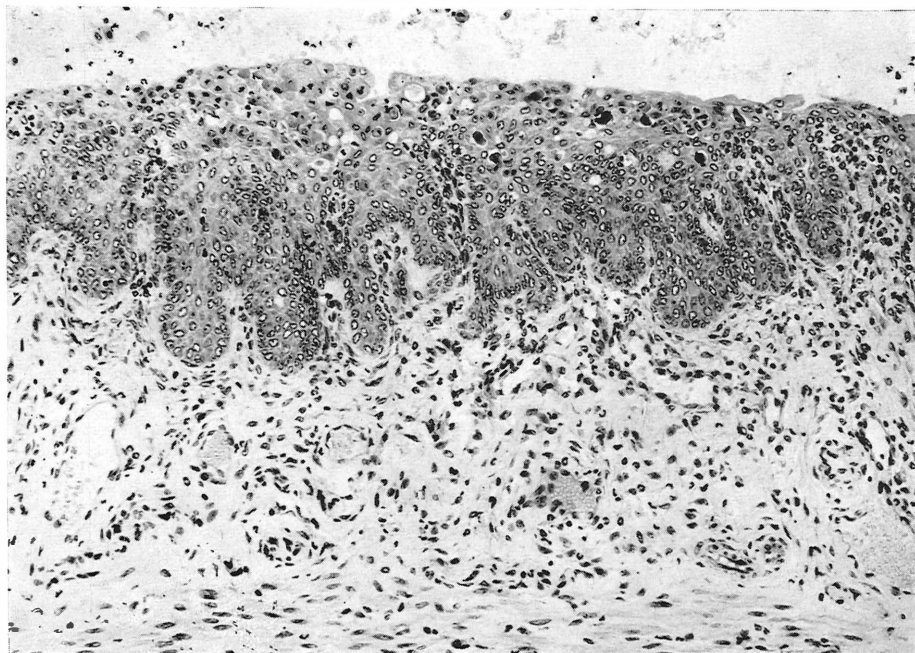


Fig. 10

Cryostaatcoupe. HE-kleuring. Vergroting 200 x. De ernst der afwijkingen neemt toe. Dyskeratotische cellen met sterk eosinofiel cytoplasma en pycnotische kernen verschijnen. De normale bouw van het epitheel is verdwenen. Zie ook het onderschrift van fig. 8.

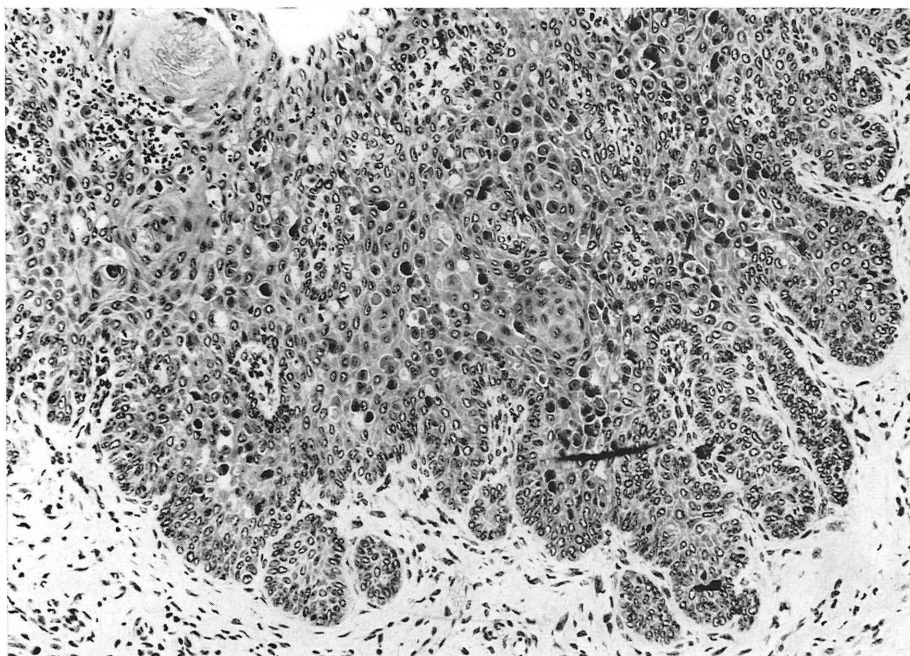


Fig. 11

Cryostaatcoupe. HE-kleuring. Vergroting 200 x. Twintig weken na de eerste penseling. De veranderingen blijken een progressief verloop te hebben. Zie ook het onderschrift van fig. 8.

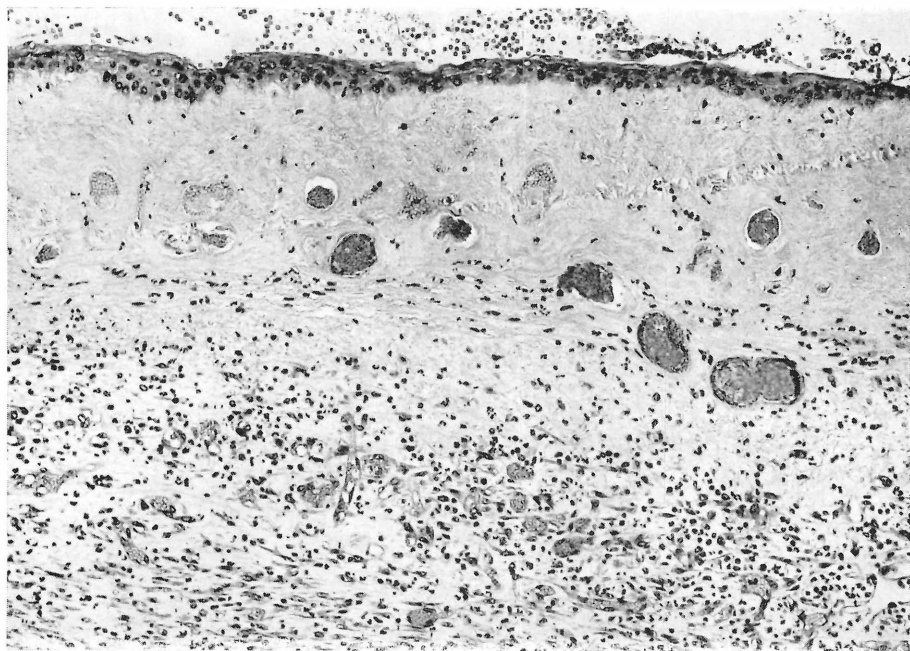


Fig. 12

Cryostaatcoupe. HE-kleuring. Vergroting 200 x. De foto's (12 - 23, behalve 19) geven de slijmvliesveranderingen weer, die bij met oestrogenen behandelde, geovariectomeerde muizen binnen 14 dagen ontstaan als de portio uteri gepenseeld wordt met 20-methylcholanthren opgelost in chloroform (1%). In fig. 12 zijn degeneratieve veranderingen van het epitheel en bindweefsel te zien met vorming van granulatieweefsel.

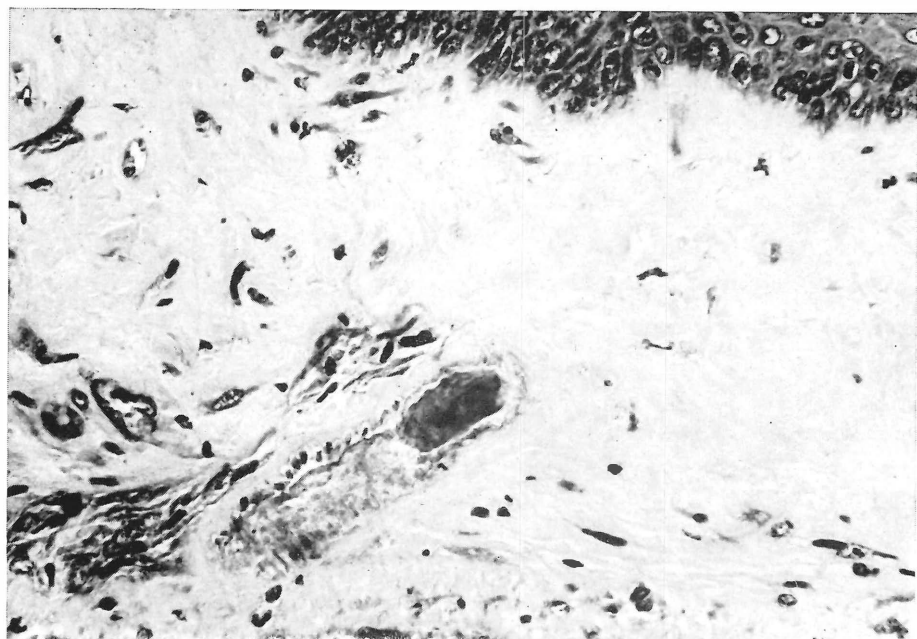


Fig. 13

Cryostaatcoupe. HE-kleuring. Vergroting 500 x. Het epitheel toont snel regeneratieve verschijnselen. Jonge vaten groeien, soms langs praeëxistente structuren in het gedegeneerde bindweefsel. Zie ook het onderschrift van fig. 12.

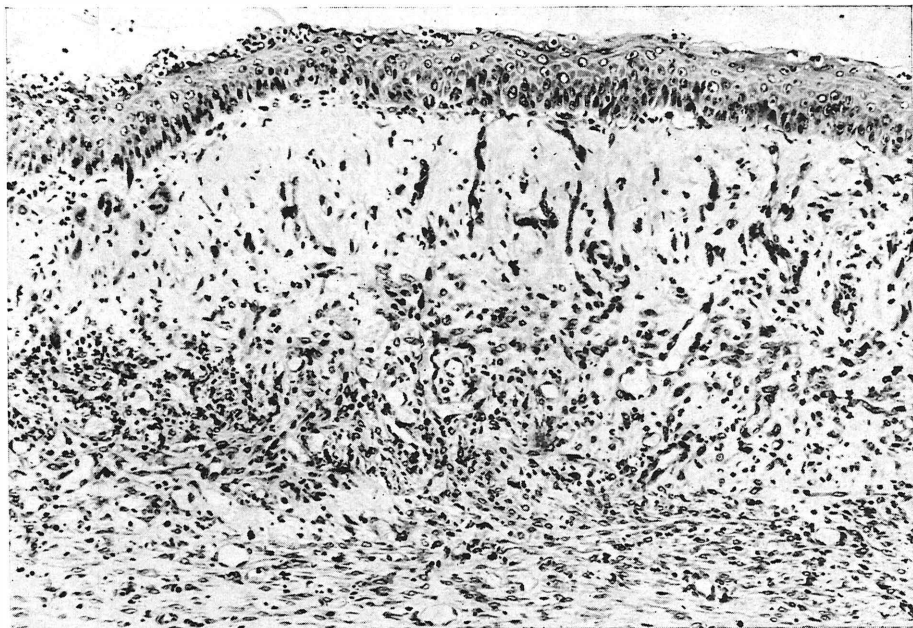


Fig. 14

Cryostaatcoupe. HE-kleuring. Vergroting 200 x. Vaatspruiten groeien in de richting van het epitheel. Tussen het epitheel en het gedegeneerde bindweefsel zijn bindweefselcellen en polynucleaire leucocyten waarneembaar. Zie ook het onderschrift van fig. 12.



Fig. 15

Cryostaatcoupe. ATP-ase. Vergroting 200 x. Met deze enzymhistochemische kleuring is het vaatverloop fraai te vervolgen. Zie ook het onderschrift van fig. 12 en fig. 14.

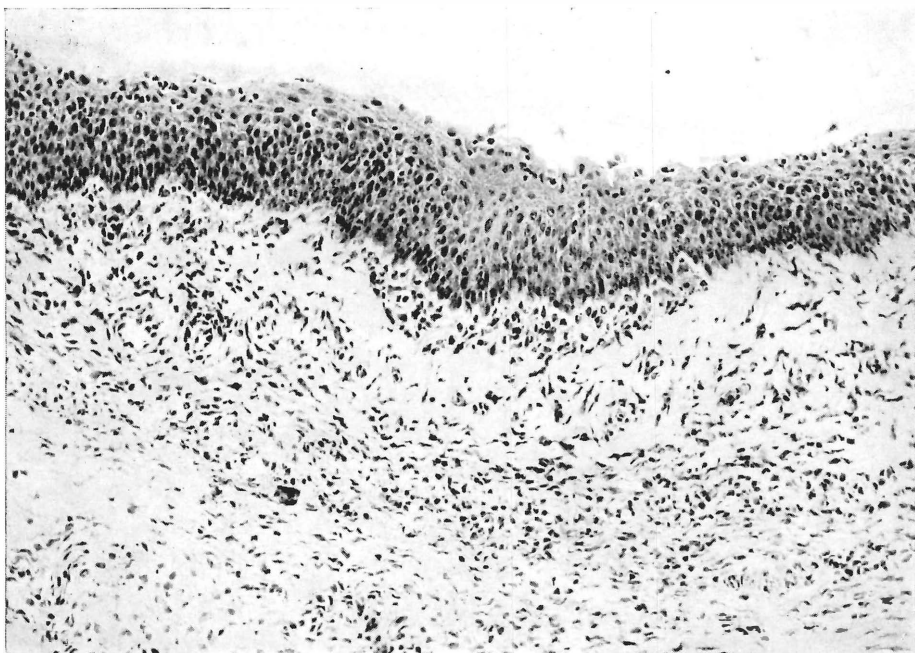


Fig. 16

Fig. 16

Cryostaatcoupe. HE-kleuring. Vergroting 200 x. Tussen het epitheel en het gedegenerende bindweefsel ontwikkelt zich een zone, bestaande uit fibroblasten en polynucleaire leucocyten. Zie ook het onderschrift van fig. 12.

Fig. 17

Cryostaatcoupe. HE-kleuring. Vergroting 200 x. Duidelijke polymorfie van de epitheelkernen. Enige epitheelcellen zijn in het nieuw gevormde bindweefselbed afgedruppeld, waarvan één met een kerndelingsfiguur (zie pijltje). Zie ook het onderschrift van fig. 12.

Fig. 18

Cryostaatcoupe. PAS-kleuring. Vergroting 200 x. Het glycogeen is uit het afwijkende epitheel verdwenen. De basale membraan verloopt onregelmatig, is plaatselijk verdikt, elders verdwenen. Om de afgedruppelde cellen is basale membraansubstantie waarneembaar. Zie ook het onderschrift van fig. 12 en vergelijk deze afbeelding met fig. 17.

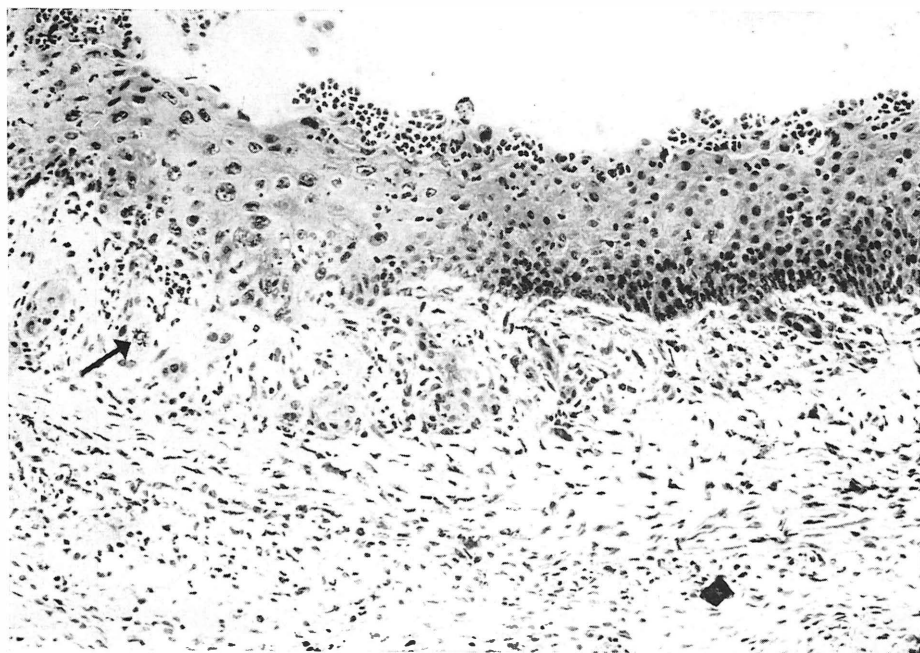


Fig. 17

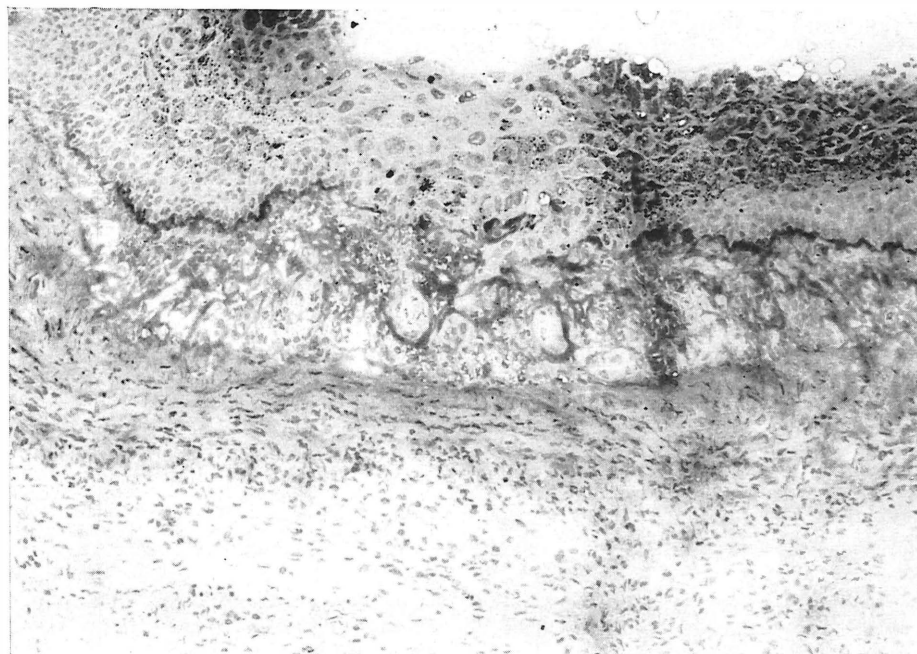


Fig. 18

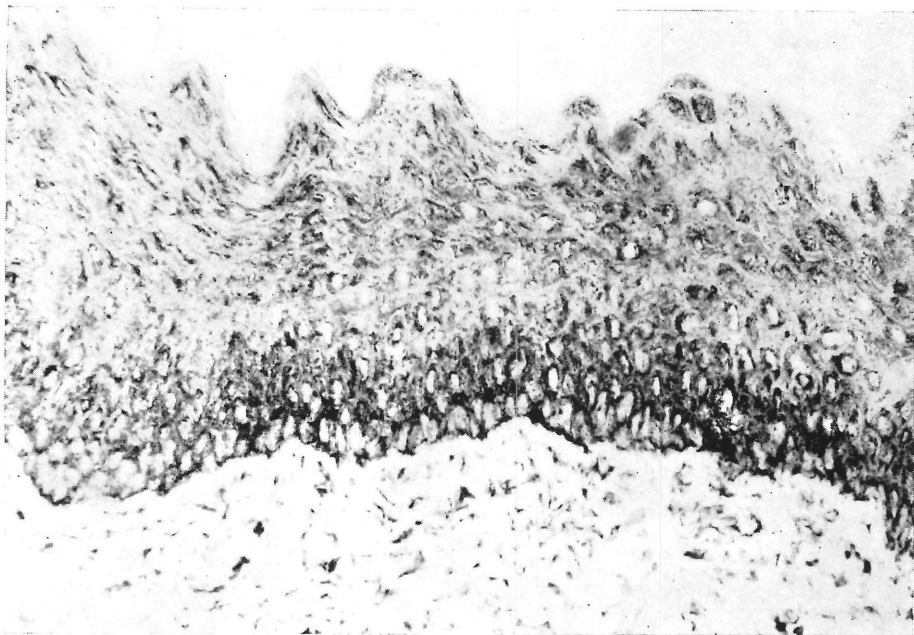


Fig. 19

Cryostaatcoupe. NADPH-tetrazolium reductase. Vergroting 500 x. Het normale verdelingspatroon van dit enzymesysteem is zichtbaar. De perifere localisatie van de formazankorrels in de cellen doet in de basale cellen ogenschijnlijk een lijntje ontstaan.

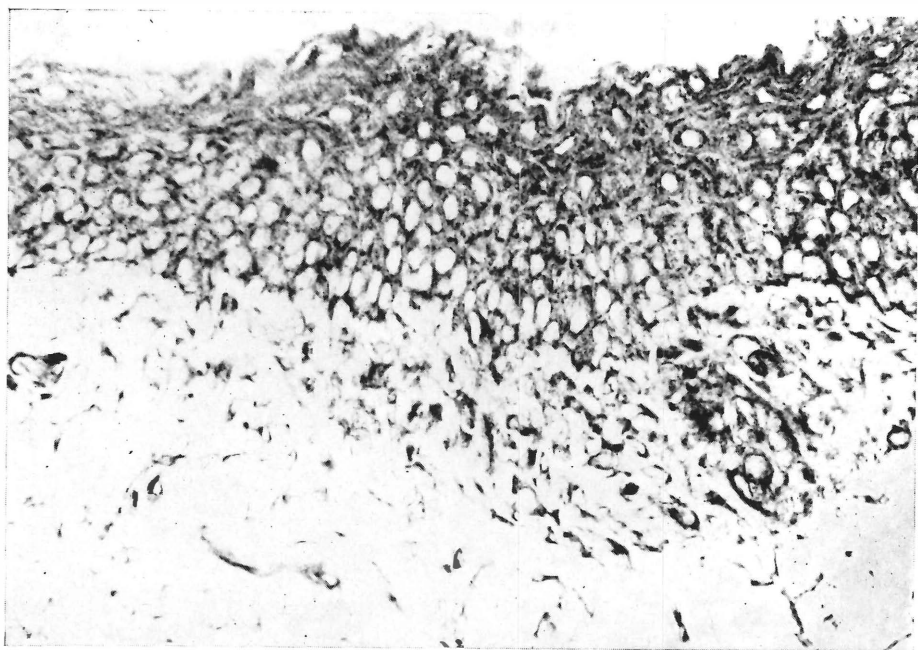


Fig. 20

Cryostaatcoupe. NADPH-tetrazolium reductase. Vergroting 500 x. Bij de afdrupeling der epitheelcellen is het door de formazankorrels gevormde lijntje verdwenen. De jonge bindweefselcellen tonen een sterke dehydrogenaseactiviteit. Zie ook het onderschrift van fig. 12 en vergelijk deze afbeelding met fig. 19.



Fig. 21

Paraffinecoupe. HE-kleuring. Vergroting 200 x. De afgedruppelde cellen vormen door deling en appositie groepjes. Zie ook het onderschrift van fig. 12.

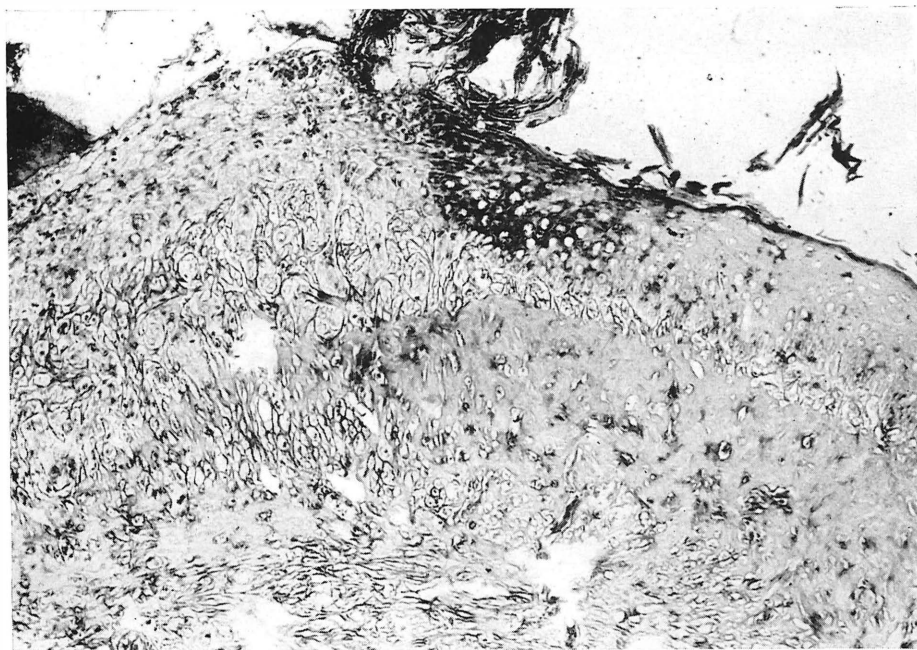


Fig. 22

Paraffinecoupe. Reticulinekleuring. Vergroting 200 x. De afgedruppelde epitelcellen duwen het fijne netwerkje, bestaande uit argyrofiele vezels voor zich uit. Plaatselijk zijn deze vezels onderbroken. Zie ook het onderschrift van fig. 12 en vergelijk deze afbeelding met fig. 21.

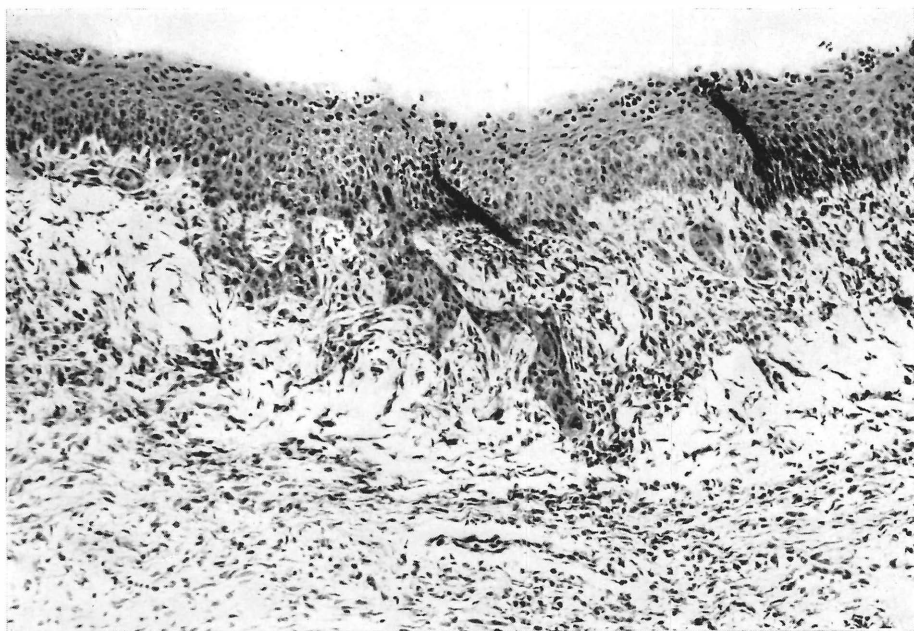


Fig. 23

Cryostaatcoupe. HE-kleuring. Vergroting 200 x. De in het bindweefsel nieuw gevormde celgroepjes kunnen met elkaar en het erboven gelegen epitheel contact krijgen. Zie ook het onderschrift van fig. 12.



Fig. 24

Cryostaatcoupe. HE-kleuring. Vergroting 200 x. Dysplastisch epitheel. Graad III. Deze veranderingen ontwikkelden zich na 10 weken bij een geovariectomeerde C_5H -muis, die de eerste 14 dagen 6 maal gepenseeld werd op de portio uteri met chloroform en gedurende de gehele proef tweemaal per week $2,5 \mu\text{g}$ oestradiol- 17β monobenzoaat toegediend kreeg.



Fig. 25

Cryostaatcoupe. HE-kleuring. Vergroting 80 x. Dysplastisch epitheel. Graad III. Deze veranderingen ontwikkelden zich na 10 weken bij een geovariectomeerde C_3H -muis, die de eerste 14 dagen 6 maal gepenseeld werd op de portio uteri met een 1% oplossing van 20-methylchlanthreen in chloroform. Gedurende de gehele proef werd tweemaal per week $2,5 \mu\text{g}$ oestradiol-17 β monobenzoaat toegediend.

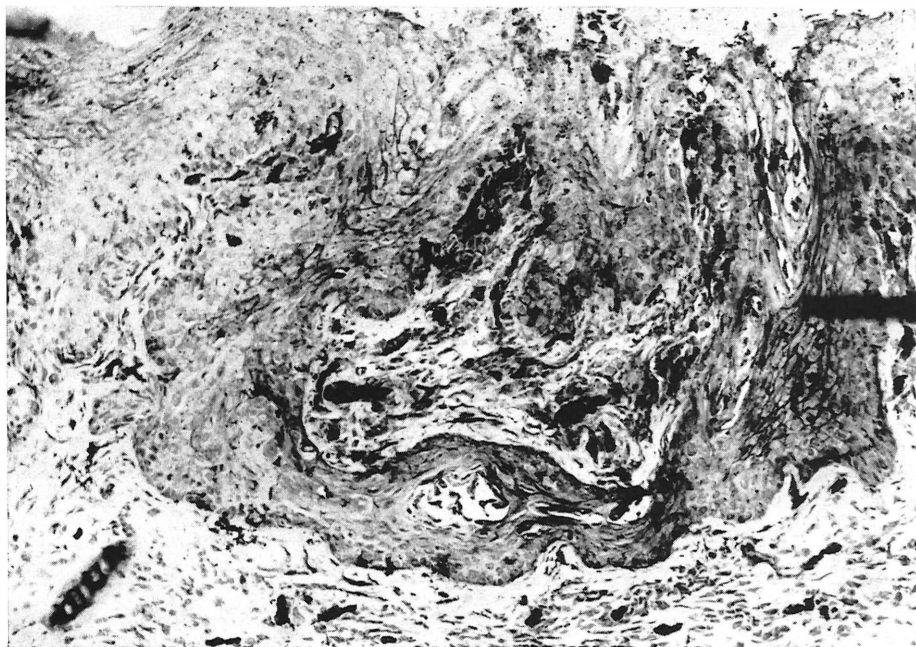


Fig. 26

Cryostaatcoupe. 5-Nucleotidase. Vergroting 200 x. Hoewel nog geen solitair groeiende epitheelvelden ontstaan zijn, toont het afwijkende epitheel reeds een stijging van de 5-nucleotidase activiteit. Zie ook het onderschrift van fig. 25.

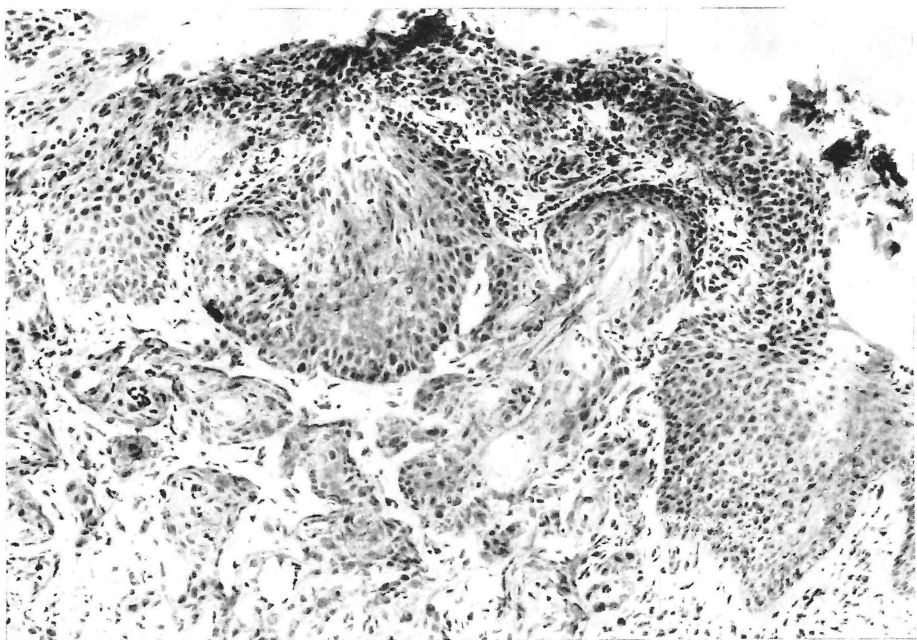


Fig. 27

Fig. 27

Cryostaatcoupe. HE-kleuring. Vergroting 200 x. Naast dysplastisch epitheel is infiltratief groeiend carcinoom te zien. Deze afwijkingen ontwikkelden zich bij een muis, die dezelfde behandeling onderging als de onder fig. 25 beschreven muis.

Fig. 28

Cryostaatcoupe. PAS-kleuring. Vergroting 200 x. Om het dysplastische epitheel is de basale membraan behouden; om het tumorweefsel is deze verdwenen. Evenals in het dysplastische epitheel wordt in het tumorweefsel nog glycogeen gevormd. Zie ook het onderschrift van fig. 27.

Fig. 29

Cryostaatcoupe. 5-Nucleotidase. Vergroting 200 x. De enzymactiviteit is uit het dysplastische epitheel verdwenen, maar sterk gestegen in het tumorweefsel. Zie ook het onderschrift van fig. 27.

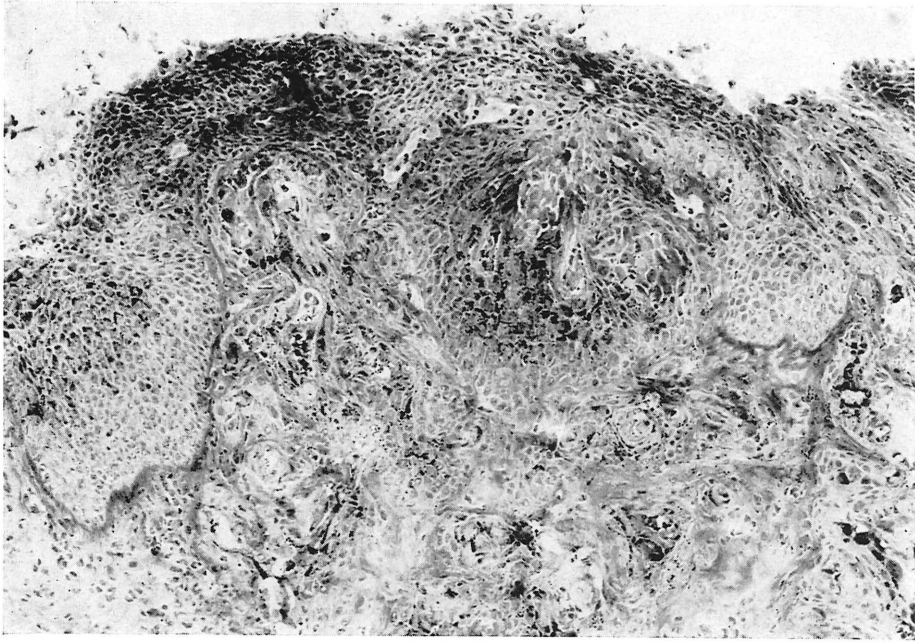


Fig. 28



Fig. 29

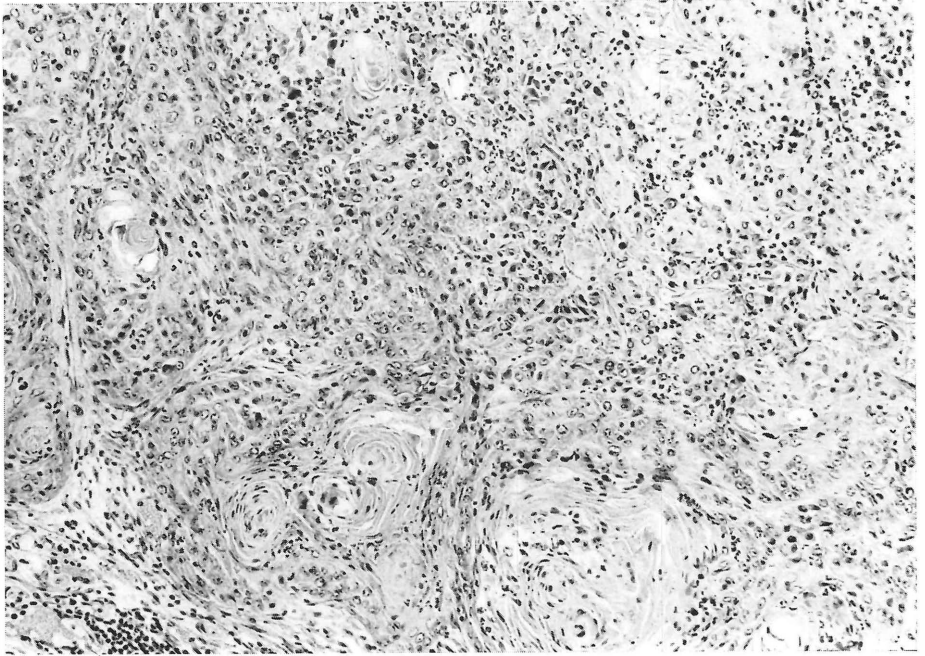


Fig. 30

Paraffinecoupe. HE-kleuring. Vergroting 200 x. Gedifferentieerd planocellulair carcinoom met hoornparelvorming. Deze tumor werd gevonden 18 weken na de eerste penseling van de portio uteri met 20-methylcholanthreen opgelost in chloroform (1 %) bij een normale virginele muis. Gedurende 9 weken werd driemaal per week gepenseeld.

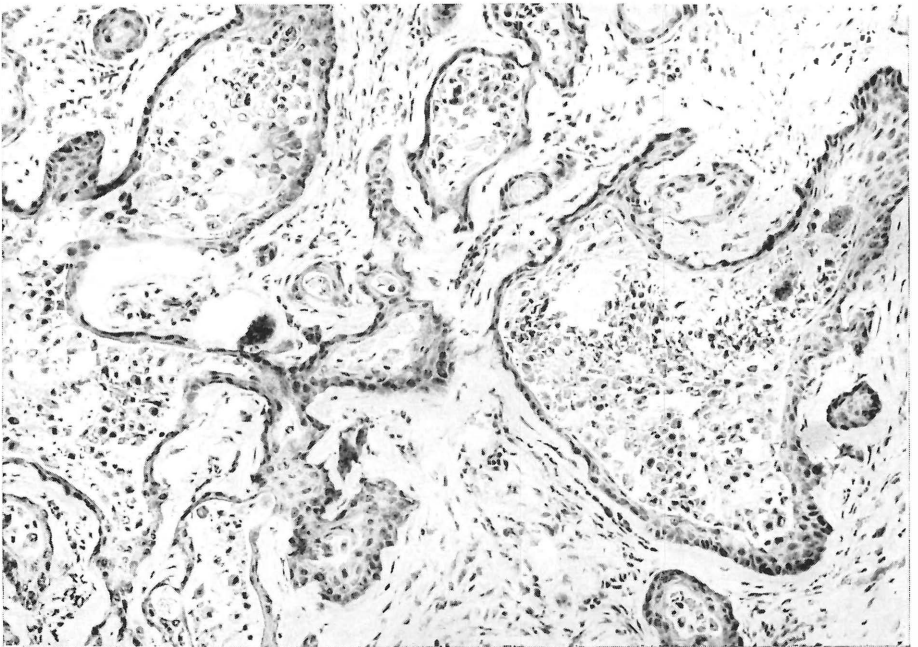


Fig. 31

Cryostaatcoupe. HE-kleuring. Vergroting 200 x. Minder gedifferentieerd tumorweefsel met vorming van cysteuze holten, waarin veel kernhoudende epitheelcellen. Deze tumor werd 23 weken na de eerste penseling van de portio uteri met een 1 % oplossing van 20-methylcholanthreen in chloroform bij een geovariectomeerde muis gevonden, die gedurende 9 weken driemaal per week gepenseeld werd en gedurende de gehele proef tweemaal per week 0,5 μ g oestradiol-17 β monobenzoaat subcutaan toegediend kreeg.

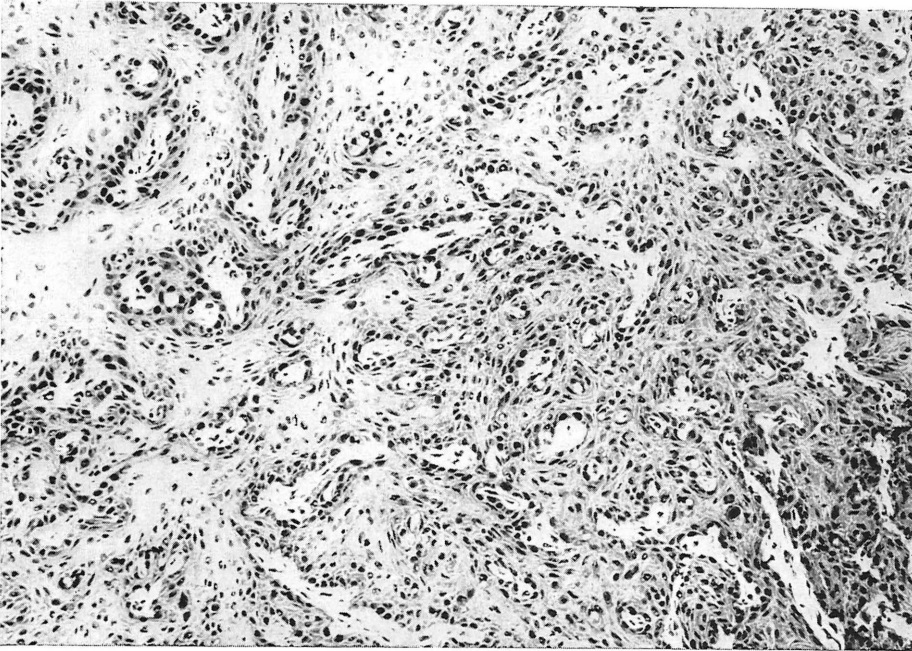


Fig. 32

Cryostaatcoupe. HE-kleuring. Vergroting 200 x. Anaplastisch carcinoom. Grote onregelmatig gevormde tumorvelden overheersen het beeld. Deze tumor werd 14 weken na de eerste penseling gevonden bij een muis, die dezelfde behandeling ondergaan had als de onder fig. 31 beschreven muis.

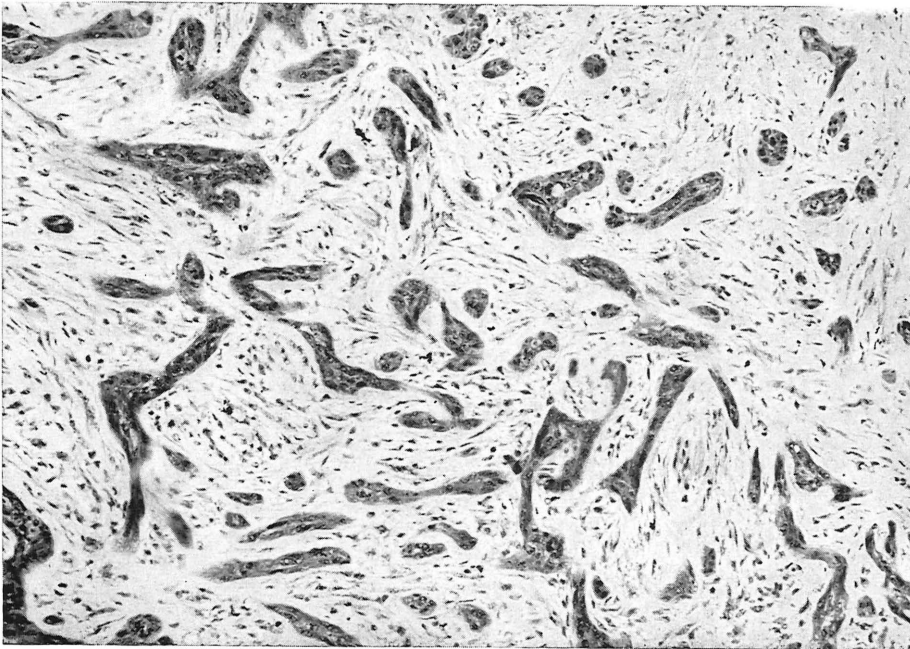


Fig. 33

Cryostaatcoupe. HE-kleuring. Vergroting 200 x. Anaplastisch carcinoom. Sprietvormige tumorvelden doorkruisen het stroma. Deze tumor werd 23 weken na de eerste penseling gevonden bij een muis, die dezelfde behandeling ondergaan had als de onder fig. 31 beschreven muis.

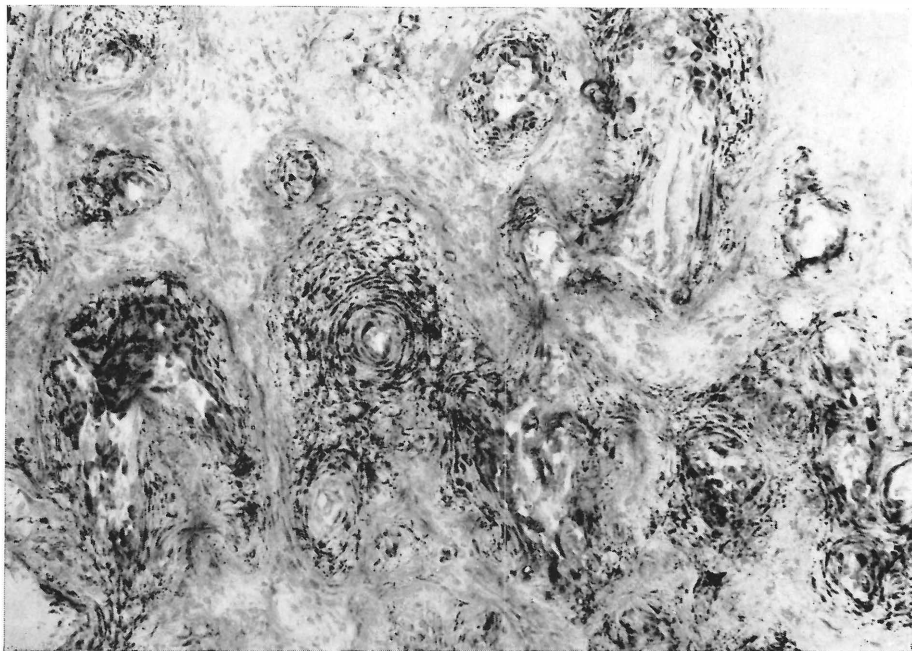


Fig. 34

Cryostaatcoupe. PAS-kleuring. Vergroting 200 x. Sommige tumorcellen produceren veel glycogeen. Een basale membraan ontbreekt. Deze tumor werd 14 weken na de eerste penseling gevonden bij een muis, die dezelfde behandeling ondergaan had als de onder fig. 31 beschreven muis.

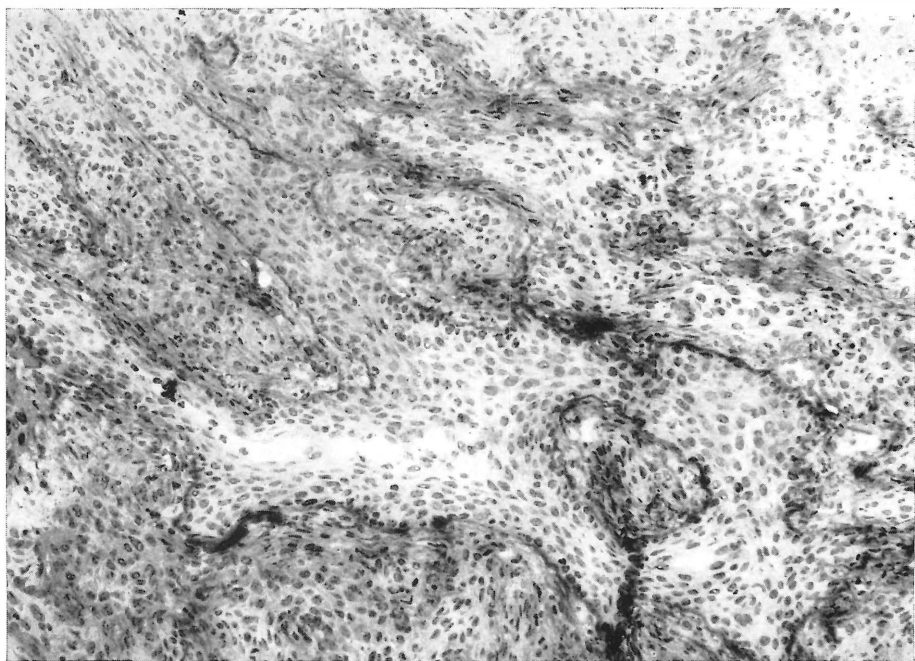


Fig. 35

Cryostaatcoupe. PAS-kleuring na behandeling met diastase. Vergroting 200 x. Om sommige tumorvelden heeft zich een basale membraan gevormd. Deze tumor werd 14 weken na de eerste penseling gevonden bij een muis, die dezelfde behandeling ondergaan had als de onder fig. 31 beschreven muis.

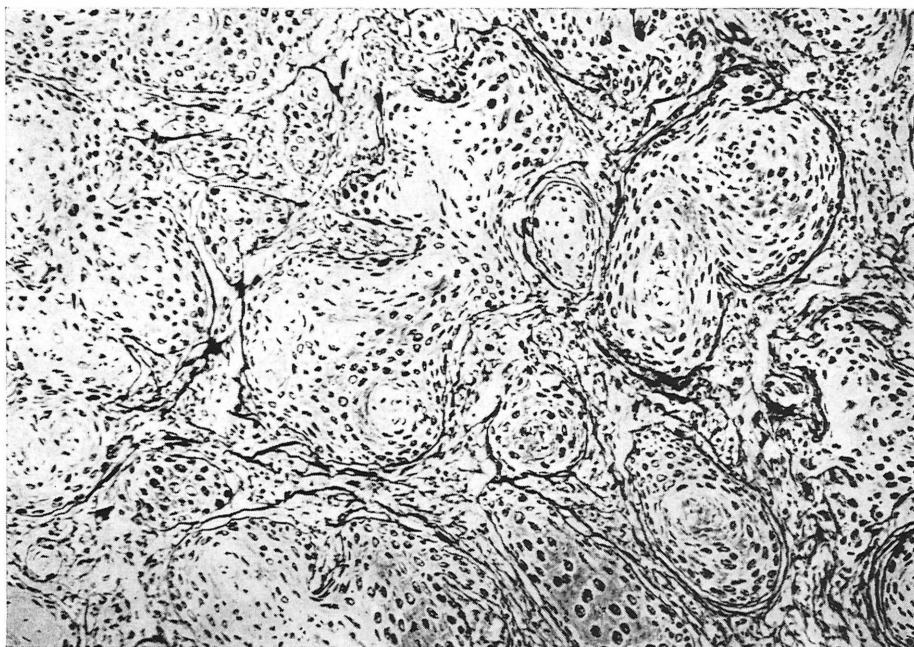


Fig. 36

Cryostaatcoupe. Reticulinekleuring. Vergroting 200 x. Om sommige tumorvelden is een fijn netwerkje van argyrofiele vezels gevormd. Deze tumor werd 14 weken na de eerste penseling gevonden bij een muis, die dezelfde behandeling ondergaan had als de onder fig. 31 beschreven muis.

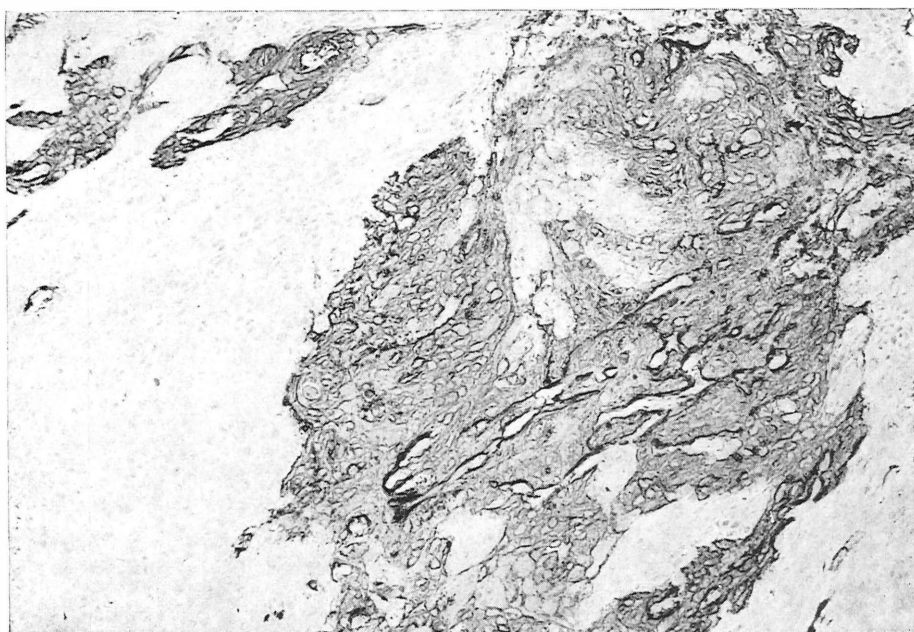


Fig. 37

Cryostaatcoupe. 5-Nucleotidase. Vergroting 200 x. De enzymactiviteit is in vele tumorvelden sterk gestegen. Naast gebieden met een sterke activiteit worden evenwel tumorvelden zonder enzymactiviteit aangetroffen. Deze tumor werd 18 weken na de eerste penseling gevonden bij een muis, die dezelfde behandeling ondergaan had als de onder fig. 31 beschreven muis.

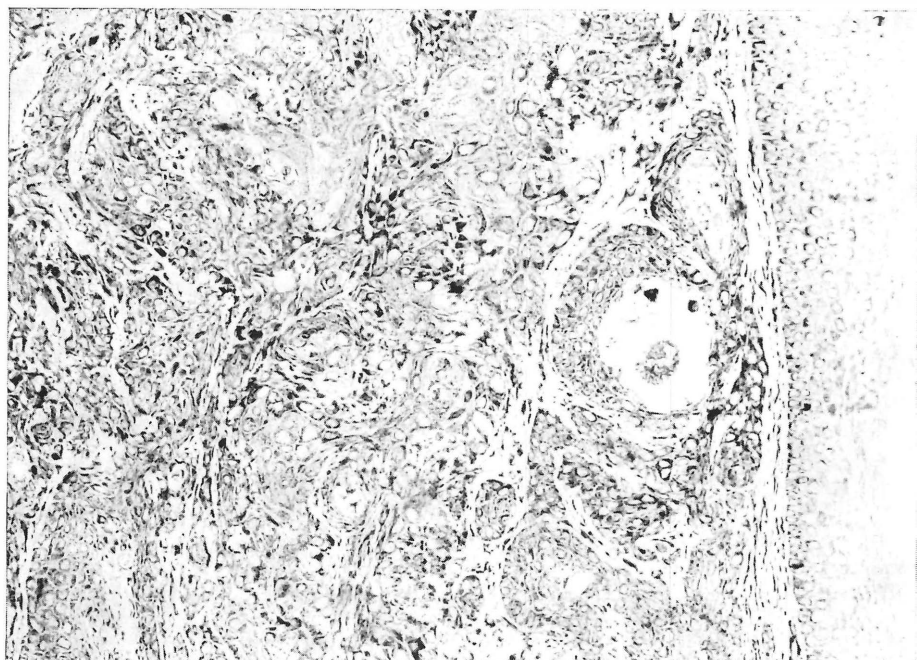


Fig. 38

Cryostaatcoupe. NADH-tetrazoliumreductase. Vergroting 200 x. Rechts is een stukje normaal plaveiselcelepitheel. De enzymactiviteit is in het tumorweefsel gestegen. Deze tumor werd 18 weken na de eerste penseling gevonden bij een muis, die dezelfde behandeling had ondergaan als de onder fig. 31 beschreven muis.

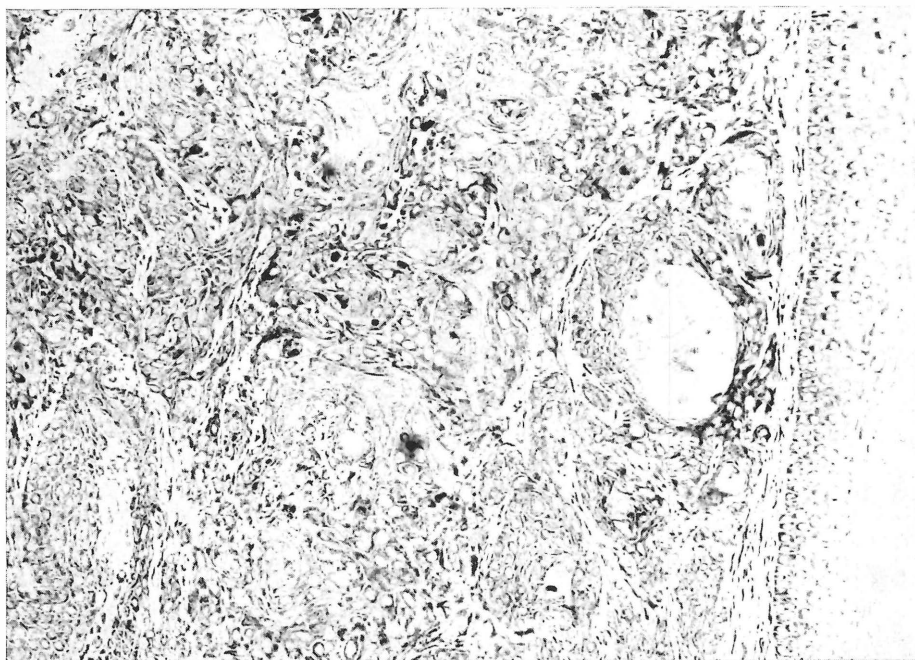


Fig. 39

Cryostaatcoupe. Melkzuurdehydrogenase. Vergroting 200 x. Dezelfde verdeling van de enzymactiviteit als van die in fig. 38. Zie ook het onderschrift van fig. 38

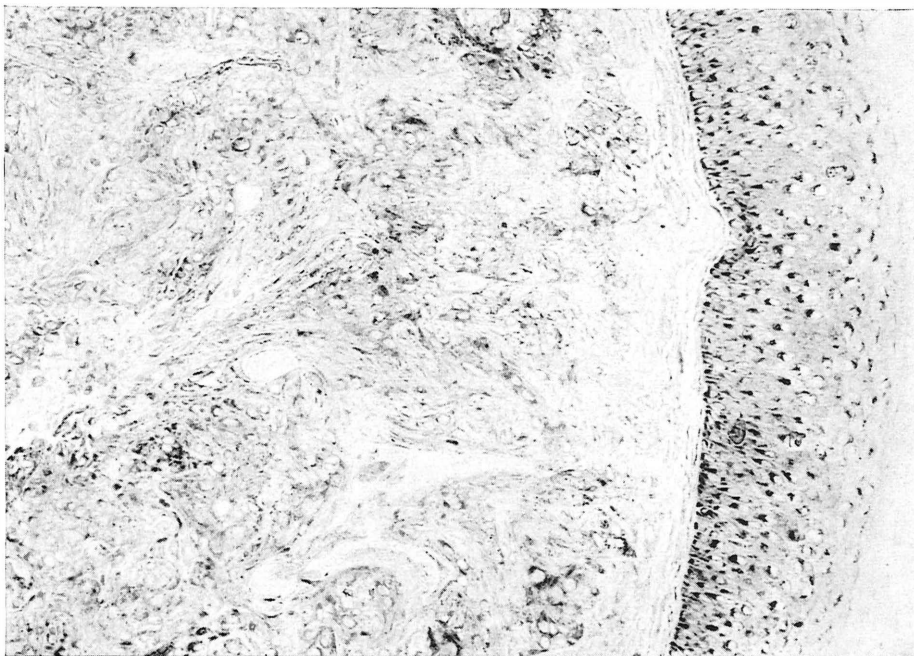


Fig. 40

Cryostaatcoupe. β -Hydroxybuttery acid dehydrogenase. Vergroting 200 x. De enzymactiviteit van het tumorweefsel is opmerkelijk gedaald. Zie ook het onderschrift van fig. 38.

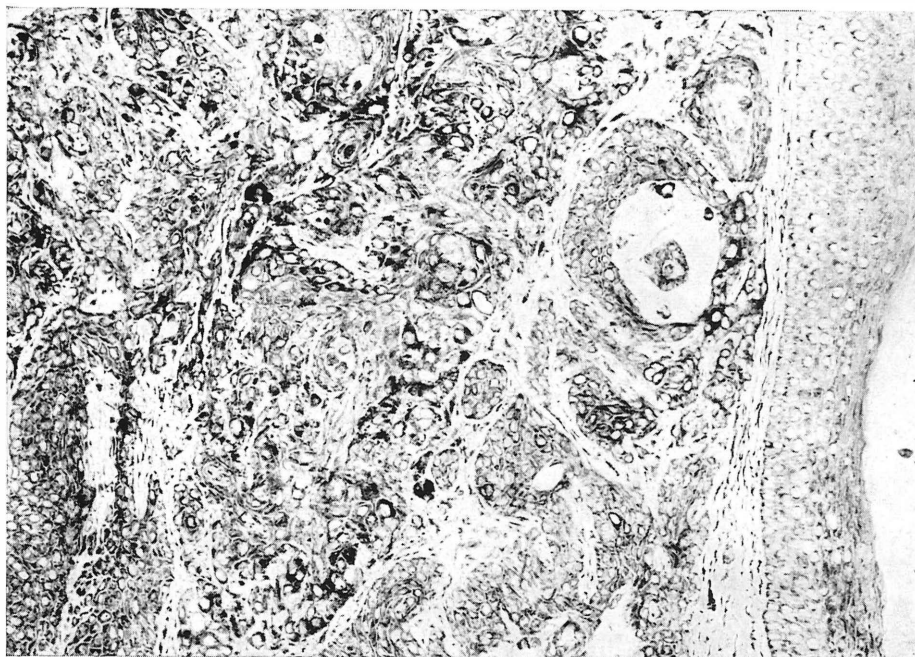


Fig. 41

Cryostaatcoupe. NADPH-tetrazoliumreductase. Vergroting 200 x. De activiteit van dit enzymesysteem is in het carcinoom sterk gestegen. Zie ook het onderschrift van fig. 38.

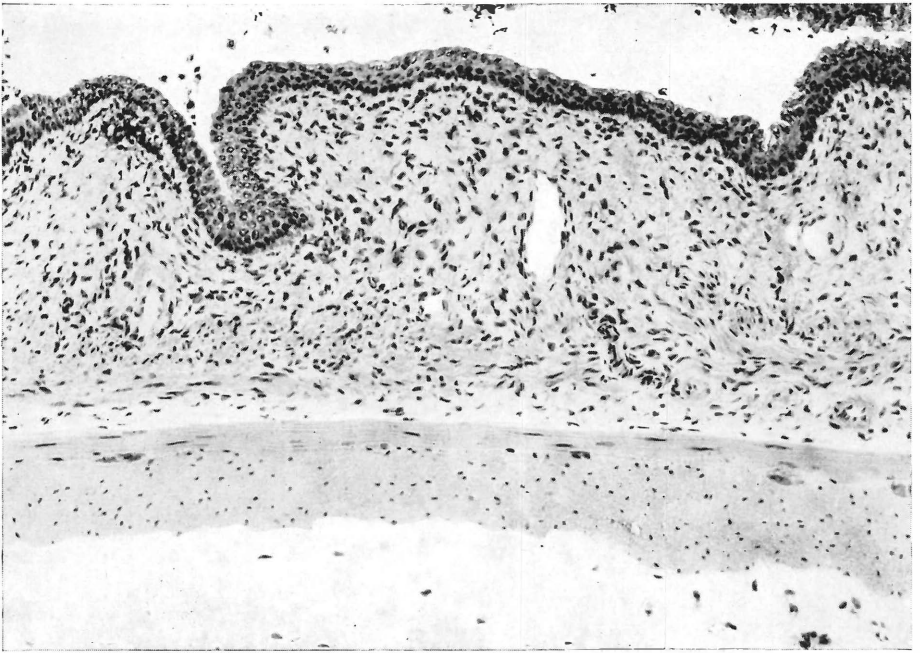


Fig. 42

Cryostaatcoupe. HE-kleuring. Vergroting 200 x. Het slijmvlies van de vagina van een muis één week na een dubbelzijdige ovariectomie. Enkele oppervlakkige cellen verslijmen.

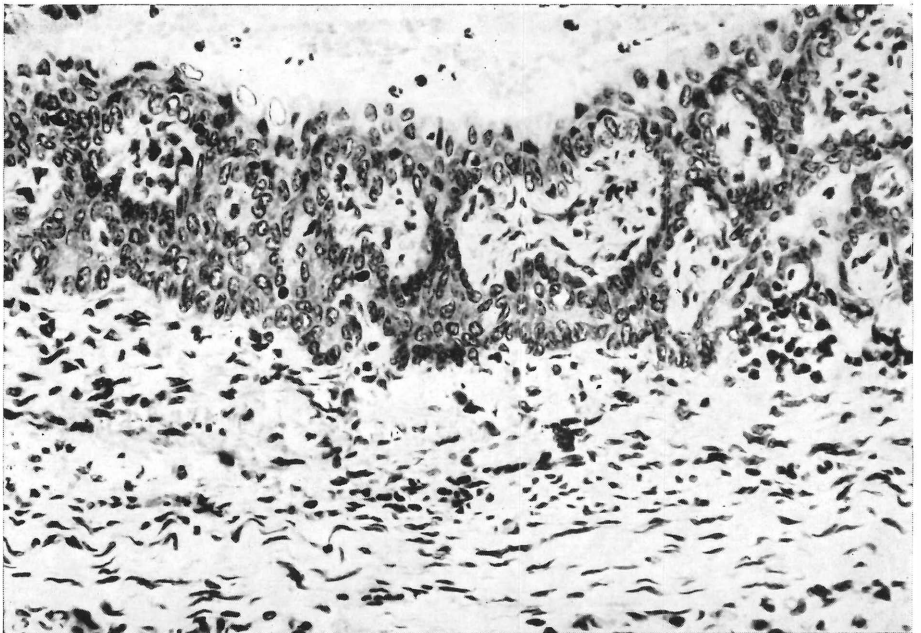


Fig. 43

Cryostaatcoupe. HE-kleuring. Vergroting 500 x. Gedurende 2 weken werden geovariectomeerde muizen behandeld met 5 μ g oestradiol-17 β monobenzoaat per week, terwijl 3 x per week de portio uteri gepenseeld werd met een 1% oplossing van 20-methylcholanthreen in chloroform. Acht weken na deze behandeling werden de muizen opgeofferd. Naast ongedifferentieerd plaveisel-epitheel werden dysplastische epitheelhaardjes aangetroffen zonder duidelijke delingsactiviteit der cellen.

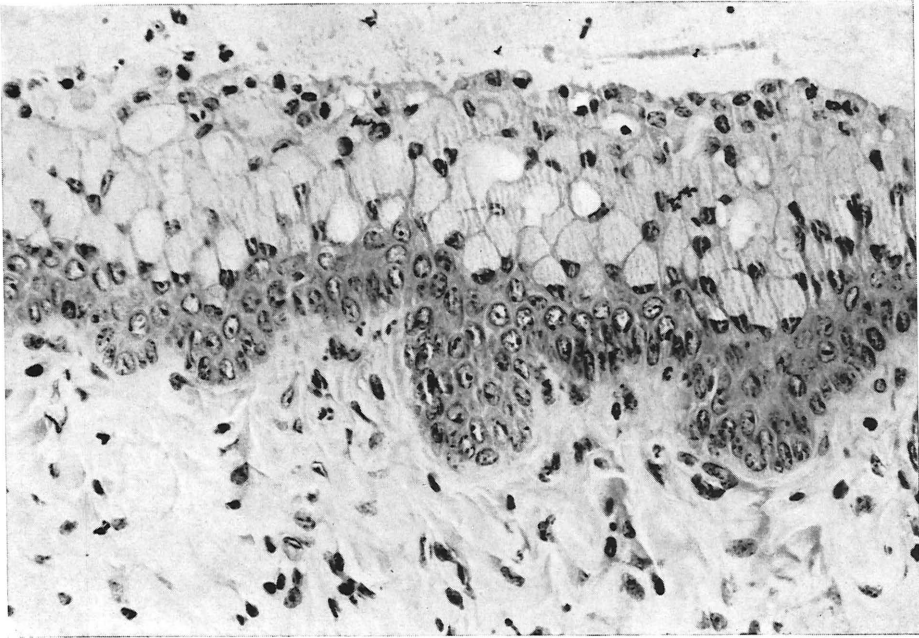


Fig. 44

Paraffinecoupe HE-kleuring. Vergroting 500 x. Vaginaslijmvlies van een geovariectomeerde muis, die per week 1 μg oestradiol-17 β monobenzoaat en 10 mg progesteron ingespoten kreeg. Aan het oppervlak is een brede laag slijmvormende epitheelcellen ontstaan.

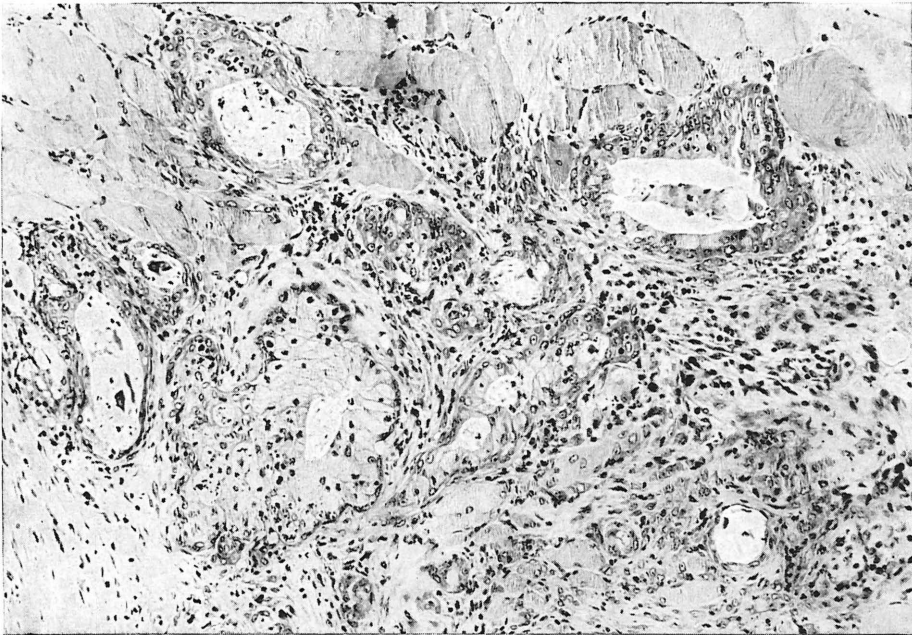


Fig. 45

Paraffinecoupe. HE-kleuring. Vergroting 200 x. Muco-epidermoid carcinoom, dat in de spierlaag van het rectum groeit. Deze tumor is afkomstig van een geovariectomeerde muis, die gedurende 2 weken op de portio uteri gepenseeld werd met een 1% oplossing van 20-methylcholanthreen in chloroform. Tijdens de 10 weken durende proef werd per week 1 μg oestradiol-17 β monobenzoaat en 10 mg progesteron subcutaan ingespoten.

GERAADPLEEGDE LITERATUUR

- ABELL, C. W., C. HEIDELBERGER - Interaction of carcinogenic hydrocarbons with tissues. VIII. Binding of tritium-labeled hydrocarbons to the soluble proteins of mouse skin. *Cancer Res.* 22, 931-946, 1962.
- ALLEN, E. - The oestrus cycle in the mouse. *Am. J. Anat.* 30, 297-371, 1922.
- ALLEN, E. en W. U. GARDNER - Cancer of the cervix of the uterus in hybrid mice following long continued administration of estrogen. *Cancer Res.* 1, 359-366, 1941.
- ALLISON, A. C. en L. MALLUCI - Uptake of hydrocarbon carcinogens by lysosomes. *Nature* 203, 1024-1027, 1964.
- ALVIZOURI, M., V. RAMIREZ DE PITA - Experimental carcinoma of the cervix. Hormonal influences. *Am. J. Obst. & Gynec.* 89, 940-945, 1964.
- ASHWORTH, C. F., V. A. STEINBRIDGE en F. J. LUIBEL - A study of the basement membranes of normal epithelium, carcinoma in situ and invasive carcinoma of the uterine cervix utilising electron microscopy and histochemical methods. *Acta Cytologica* 5, 369-384, 1961.
- ATTRAMADAL, A. - A Method for exact intracellular localization of tritiated sex hormones by autoradiography. *Acta path. et microbiol. scandinav.* 61, 150-151, 1964.
- BAUER, K. H. - *Mutationstheorie der Geschwulstentstehung* (Berlin, 1928).
- BAUER, K. H. - *Das Krebsproblem*. Springer-Verlag (Berlin, Göttingen, Heidelberg) 1949.
- BERENBAUM, M. C. - Effect of carcinogens on immune processes. *Brit. Med. Bull.* 20, 159-164, 1964.
- BERENBLUM, I. - The carcinogenic action of croton resin. *Cancer Res.* 1, 44-48, 1941.
- BERENBLUM, I. - Two-stage mechanisms of carcinogenesis. In: *Cellular control mechanisms and cancer*, 257-267. Emmelot, P. en O. Mühlbock (Ed.), Amsterdam-Londen-New York, Elsevier Publ. Comp. 1964.
- BERENBLUM, I., P. SHUBIK - A new, quantitative, approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. *Brit. J. Cancer* 1, 383-391, 1947.
- BETHKE, R. - Multiple Tumoren im Nasenhorn. *Frankf. Z. Path.* 6, 19-26, 1911.
- BIGGERS, J. D. - The carbohydrate components of the vagina of the normal and ovariectomized mouse during oestrogenic stimulation. *J. Anat. (Lond.)* 87, 327-336, 1953.
- BILLINGHAM, R. E., J. W. ORR en D. L. WOODHOUSE - Transplantation of skin components during chemical carcinogenesis with 20-methylcholanthrene. *Brit. J. Cancer* 5, 417-432, 1951.
- BJERSING, L. en N. E. BORGLIN - Effect of hormones on incidence of uterine eosinophilia in rats. *Acta path. et microbiol. scand.* 60, 27-35, 1964.
- BOGACZ, J. en I. KOPROWSKA - A cyto-pathologic study of potentially carcinogenic properties of air pollutants. *Acta Cytologica* 5, 311-319, 1961.
- BOSS, J. H. - Antigens in membranes and fibrillar structure of human tissues. *Arch. of Path.* 76, 434-445, 1963.

- BOYD, J. T. en R. DOLL - A study of the aetiology of carcinoma of the cervix uteri. *Brit. J. Cancer* 18, 419-434, 1964.
- BOYLAND, E., R. T. CHARLES en B. F. C. GOWING - The induction of tumours in mice by intravaginal application of chemical compounds. *Brit. J. Cancer* 15, 252-256, 1961.
- BOUCEK, Z. - Mitteilungen über 35 histologisch untersuchte Tiergeschwülste. *Arch. wiss. prakt. Tierheilk.* 32, 585-600, 1906.
- BOUTWELL, R. K., H. P. RUSCH - The absence of an inhibiting effect of caloric restriction on papilloma function. *Cancer Research* 17, 71-75, 1957.
- BOUTWELL, R. K., D. BOSCH en H. P. RUSCH - On the role of croton oil in tumor formation. *Cancer Res.* 17, 70-75, 1957.
- BOUTWELL, R. K. - Some biological aspects of skin carcinogenesis. *Progr. exp. Tumor Res.* 4, 207-250, 1964. Karger, Basel-New York.
- BROOKES, P. en P. D. LAWLEY - Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin. Relations between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid. *Nature* 202, 781-784, 1964.
- BULLOUGH, W. S. - Growth regulation by tissue-specific factors. In: *Cellular control mechanisms and cancer*. Emmelot, P. en O. Mühlbock (Ed.), Amsterdam-Londen-New York, Elsevier Publ. Comp., 124-145, 1964.
- BULLOUGH, W. S. en T. RYTÖMAA - Mitotic homeostasis. *Nature* 205, 573-578, 1965.
- BURNET, F. M. - Immunological factors in the process of carcinogenesis. *Brit. Med. Bull.* 20, 154-158, 1964.
- BURSTONE, M. S. - *Enzyme histochemistry*. Acad. Press, New York 1962.
- CASSELMAN, W. G. B. - *Histochemical technique*. Methuen's Monographs on biological subjects, London-New York 1962.
- CHU, E. W., K. McD HEROLD en T. A. WOOD - Cytopathological changes of the uterine cervix of Syrian hamsters after painting with DMBA benzopyrene and tobacco tar. *Acta Cyt. (Phil.)* 6, 376-384, 1960.
- CLEVER, U. en P. KARLSON - Induktion von Puff-veränderungen in den Speicheldrüsenchromosomen von *Chironomus tentans* durch Ecdyson. *Exp. Cell. Res.* 20, 623-626, 1960.
- COTCHIN, E. - Spontaneous uterine cancer in animals. *Brit. J. Cancer* 18, 209-227, 1964.
- CRAMER, W., R. E. STOWELL - The early stages of carcinogenesis by 20-methylcholanthrene in the skin of the mouse. *J. of Nat. Cancer Inst.* 2, 369-378, 1942.
- CHRISTOPHERSON, W. M. en W. H. BROGHAMER - Progression of experimental dysplasia in mouse. *Cancer* 12, 201-204, 1961.
- CROSSEN, R. J. en L. LOEB - Long-continued administration of an estrogen on the sex organs of mice. *Arch. Path.* 37, 202-212, 1944.
- DANNENBERG, H. - Zum Wirkungsmechanismus Krebserzeugender Faktoren. *Deutsch. Med. Wschr.* 88, 605-616, 1963.
- DAOUST, R. - The mitotic activity in rat liver during DAB carcinogenesis. *Cancer Res.* 22, 743-747, 1962.
- DEELMAN, H. T. - Die Entstehung des experimentellen Teerkrebses und die Bedeutung der Zellregeneration. *Z. Krebsforsch.* 21, 220-226, 1924.
- DEELMAN, H. T. - The part played by injury and repair in the development of cancer. *Brit. Med. J.* 1, 872, 1927.
- DEFENDI, V. en R. A. ROOSA - Effect of thymectomy on induction of tumors and on the transplantability of polyoma-induced tumors. *Cancer Res.* 25, 300-306, 1965.

- DONGEN, J. A. van - Haematogene metastasen. Diss. Amsterdam, 1961.
- DONTENWILL, W., U. MOHR en J. BERNHARD - Die unterschiedliche Wirkung des Follikelhormons auf die Portio- und Vaginalschleimhaut bei parenteraler und lokaler Applikation. Z.Krebsforsch. 303-308, 1963.
- DORFMAN, R. I. en W. U. GARDNER - Metabolism of steroid hormones. The excretion of estrogenic material by ovariectomised mice bearing adrenal tumors. Endocrinology 34, 421-423, 1944.
- DUIJN, P. VAN en R. G. J. WILLIGHAGEN - Microscopische histochemie van enzymen. Ned. T. v. Geneesk. 105, 434-443, 1961.
- EMMELOT, P. - Cellulaire reguleringsmechanismen en kanker. Ned. T. v. Geneesk. 107, 1604-1613, 1963.
- EMMENS, C. W. (ed.) - Hormone essay. New York. Academic Press, 1950.
- FELDMAN, F. en D. YAFFE - Immunogenetic studies on X-irradiated mice treated with hematopoietic cells and grafted with tumor tissues. J. Nat. Cancer Inst. 23, 109-131, 1959.
- FELDMAN, F., D. YAFFE en A. GLOBERSON - Some cellular and molecular aspects of cytodifferentiation. In: Cellular Control Mechanisms and cancer. Ed.: P. Emmelot en O. Mühlbock (Ed.), Amsterdam-Londen-New York. Elsevier Publ. Comp., 1964, 60-79.
- FISCHER, B. - Die experimentelle Erzeugung atypischer Epithelwucherungen und die Entstehung bösartiger Geschwülste. Münch. med. Wschr. 53, 2041-2047, 1906.
- FISCHER, B. en E. R. FISCHER - Experimental evidence in support of the dormant tumorcell. Science 130, 918-919, 1959.
- FISCHER, A., H. LASER en M. MEYER - Wechselbeziehungen zwischen normalen und bösartigen Geweben. Z.Krebsforsch. 29, 270-301, 1929.
- FOULDS, L. - Mammary tumours in hybrid mice: growth and progression of spontaneous tumours. Brit. J. Cancer 3, 345-375, 1949.
- FOULDS, L. - The experimental study of tumor progression: a review. Cancer Res. 14, 327-399, 1954.
- FOULDS, L. - Some general principles of neoplastic development. Acta Unio Internationalis contra cancerum 20. 663-666, 1964.
- FREI, J. V. - The fine structure of the basement membrane in epidermal tumours. J. Cell Biology 15, 335-342, 1962.
- FRIEDMAN, N. B. - Mucous and squamous differentiation and experimental carcinoma in the rodent cervix. Am. J. Path. 18, Scientific Proceedings 12 a, 1963.
- FRIEDWALD, W. F. en P. ROUS - The initiating and promoting elements in tumor production. J. exp. Med. 80, 101-125, 1944.
- GARDNER, W. U. - Estrogenic effects of adrenal tumors of ovariectomised mice. Cancer Res. 1, 632-637, 1941.
- GARDNER, W. U. - Experimental induction of uterine cervical and vaginal cancer in mice. Cancer Res. 19, 170-176, 1959.
- GARDNER, W. U. - Carcinoma of the uterine cervix and upper vagina; induction under experimental conditions in mice. Am. N. Y. Acad. Sci. 75, 543-564, 1959.
- GARDNER, W. U. en S. C. PAN - Malignant tumors of the uterus and vagina in untreated mice of the P. M. stock. Cancer Res. 8, 241-256, 1948.
- GARDNER, W. U., E. ALLEN, G. M. SMITH en L. C. STRANG - Carcinoma of the cervix of mice receiving estrogens. J. Am. Med. Ass. 110, 1182-1183, 1938.
- GERSH, I. en H. R. CATCHPOLE - The organisation of ground substance and basement membrane and its significance in tissue injury, disease and growth. Am. J. Anat. 85, 457-507, 1949.

- GILMOUR, W. D. - An investigation into the influence of oestrone on the growth and on the genesis of malignant cells. *J. Path. Bact.* 45, 179-188, 1937.
- GLUCKSMANN, A. en C. P. CHERRY - The effect of castration and of additional hormonal treatments on the induction of cervical and vulval tumours in mice. *Brit. J. Cancer* 16, 631-652, 1962.
- GOVINDA, R. D. en I. K. S. M. BARWAB - Carcinogenic action of human smegma. *Arch. Path.* 75, 414-420, 1963.
- GROS, F. - The genetic code and its translation. In: *Cellular control mechanisms and cancer*. P. Emmelot en O. Mühlbock (Ed.), Amsterdam-Londen-New York. Elsevier Publ. Comp. 1964, 22-36.
- GURR, E. - *Methods of analytical histology and histochemistry*, London 1958.
- HAAM, M. D. VON - Die experimentelle Erzeugung des Portio-Karzinoms und seine Vorstufen in Versuchstieren. *Verhandl. deutschen Gesellschaft f. Path.*, 48. Tagung, 57-74, 1964.
- HAAM, E. VON en ALBERTY in: D. G. Scarpelli en E. von Haam - Experimental carcinoma of the uterine cervix. *Progr. exp. Tumor Res.* 1, 179-224 (Karger, Basel-New York, 1960).
- HAAM, E. VON en D. G. SCARPELLI - Experimental carcinoma of the cervix. A comparative cytologic and histologic study. *Cancer Res.* 15, 449-455, 1955.
- HADDOW, A. - Chemical carcinogens and their modification. *Brit. Med. Bull.* 14, 79-92, 1958.
- HADDOW, A. - Immunology of the cancer cell: Tumour-specific antigens. *Brit. Med. Bull.* 21, 133-139, 1965.
- HAMPERL, H. - Über die Entwicklung („Progression“) von Tumoren. *Wien. Klin. Wochenschr.* 69, 201-205, 1957.
- HALPERN, B. - Het reticulo-endotheliale systeem en de immuniteit. *Triangel* 6, 174-181, 1964.
- HARDONK, M. J. - The use of phenazinemethosulfate as an electron carrier in the histochemical demonstration of dehydrogenase. *Histochemie* 4, 563-568, 1965.
- HAYGARD, C. E. - Reproductive diseases of mares. *The Cornell Veterinarian* 46, 327-337, 1956.
- HEINS, H. C., E. J. DENNIS, H. R. PRATT-THOMAS en S. C. CHARLESTON - The possible role of smegma in carcinoma of the cervix. *Am. J. Obst. and Gynec.* 76, 726-735, 1958.
- HILLEMANS, H. G. VON - Entstehung und Wachstum des Zervixkarzinoms (Basel, S. Karger, New York), 1964.
- HISAW, F. L. en F. J. L. HISAW - Spontaneous carcinoma of the cervix uteri in a monkey (*Macaca mulatta*). *Cancer* 11, 810-816, 1958.
- HOCH-LIGATI, C. - Effect of prolonged administration of spermicidal contraceptives in rats kept on low protein or on full diet. *J. Nat. Cancer Inst.* 18, 661-685, 1957.
- HURWITZ, J. en J. T. AUGUST - The role of DNA in RNA synthesis. *Progr. Nucleic Acid Res.*, 59-92, 1963.
- IVERSEN, O. H. - Discussion on cell destruction and population dynamics in experimental skin carcinogenesis in mice. *Progr. exp. Tumor Res.* 4, 169-206, 1964, Karger, Basel, New York.
- IVERSEN, O. H. en K. MARCKER - The degree of polymerisation of hyaluronic acid isolated from the myometrium of the human cervix uteri. *Acta Pharm. et Toxicol.* 18, 101, 1961.
- IVERSEN, O. H. - The influence of estrogenic and androgenic hormones on mast cells and connective tissue in uterus of guinea pig. *Acta path. microbiol. scand.* 56, 245-252, 1962.

- IIJAMA, H., K. NASU en I. TAKI - Comparative study of carcinogenesis in squamous and columnar epithelium of mouse uterus by string method of producing cervical carcinoma. *Am. J. Obst. and Gynec.* 89, 946-965, 1964.
- JACOB, F. en J. MONOD - On the regulation of gene activity. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26, 193-209, 1961.
- JACOB, F. en J. MONOD - Elements of regulatory circuits in bacteria. UNESCO Symposium on „Biological Organisation” 1962. In: Biological organization at the cellular and supercellular level. Ed. R. J. C. Harris, London-New York, 1963.
- JENSEN, E. V. - On the mechanism of estrogen action. *Perspect. Biol. Med.* 6, 47-59, 1962.
- JENSEN, E. V. en H. I. JACOBSON - Base guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Progr. Hormone Res.* 18, 387-414, 1962.
- JOHANSSON, B. en B. WESTIN - Studies on the influence of oestrogen on the mast cells in mice. *Acta path. et microbiol. scand.* 45, 133-138, 1959.
- JULL, J. W. - The effects of oestrogens and progesterone on the chemical induction of mammary cancer in mice of the IF strain. *J. Path. Bact.* 68, 547-559, 1954.
- KAMINETZKY, H. A. en E. A. Mc GREW - Podophyllin and mouse cervix. Effect of long-term application. *Arch. Path.* 73, 481-485, 1962.
- KAMINETZKY, H. A. en M. SWERDLOW - Sex steroids and experimental invasive atypia in mice. *Am. J. Obst. and Gynec.* 89, 716-722, 1964.
- KARLSON, P. - New concepts on the mode of action of hormones. *Perspect. Biol. Med.* 6, 203-214, 1963.
- KELLSALL, M. H. en E. D. CRABB - Lymphocytes and mast cells. Williams and Wilkins, Baltimore 1959, p. 148.
- KLAVINS, J. V. en V. KAUFMAN - Neoplastic changes in cervix uteri following administration of estradiolbenzoate and 20-methylcholanthrene. *Acta Cytol.* 6, 267-272, 1962.
- KLINE, T. S. - Effect of hormones on podophyllin-induced vaginal atypies. *Arch. Path.* 75, 343, 1963.
- KLINE, B. E. en H. P. RUSCH - Some factors that influence the growth of neoplastic cells. *Cancer Res.* 4, 762-767, 1944.
- KOPROWSKI, I. - Hormones as promoting agents in carcinogenesis. *Acta Unio Int. Contra Cancrum* 20, 1419-1424, 1964.
- KOPROWSKI, I., J. BOGACZ, C. PENTIKAS en W. STYPULKOWSKI - Induced cervical carcinoma of the mouse. A quantitative cytologic method for evolution of the neoplastic process. *Cancer Res.* 18, 1186-1190, 1958.
- KRIEG, A. F. en J. W. REAGAN - Carcinogenesis of the cervix uteri in castrate mice. *Lab. Invest.* 10, 581-589, 1961.
- KUGA, K., Y. OKAMURA en S. TANAKA - Ovarian insufficiency as a factor of carcinogenesis of the cervix uteri. *Kyushu J. med. Sci.* 223-240, 1963 gerefereerd in *Excerpta Med.* 11, 1007, 1963 (Abstr. 4041).
- KVARSTEIN, B., N. HAKON en S. D. SCHULTZ-HANDT - An effect of oestrogen on chondroitin sulphate of rat skin connective tissue. *Acta endocrinologica* 44, 209-215, 1963.
- LAFFARGUE, P., A. SANSE, R. LUSCAN en H. FRANÇOIS - Cancer experimental du col utérin de la souris et son conditionnement par les oestrogènes. *Ann. anat. path.* 85-108, 1963.
- LAMMES, F. B. - Het endometrium van de muis. *Diss. Leiden* 1963.
- LAW, L. W. - Neoplasms in thymectomized mice following room infection with polyoma virus. *Nature* 205, 672-673, 1965.
- LEADING ARTICLE - Causes of cervical cancer. *Lancet* I, 690-691, 1965.

- LENDRUM, A. G. - The staining of erythrocytes in tissue sections. A new method and observations on some of the modified Mallory connective tissue stains. *J. Path. Bact.* 61, 443, 1949.
- LEVAN, A. en J. J. BIESELE - Role of chromosomes in cancerogenesis as studied in serial tissue culture of mammalian cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 71, 1022-1053, 1958.
- LI MIN-HSIN, TS'AI HAI-YING en WEI-HUI-CHÜAN - Observation on the trauma-induced neoplastic changes in the uterine cervix of mice. *Chin. Med. J.* 792-799, 1962.
- LI MIN-HSIN, TS'AI HAI-YING, CH'EN TING-HSIEN en TSUNG YUNG-SHENG - Influence of hormones on carcinogenesis of uterine cervix of mice induced by methylcholanthrene. *Chin. Med. J.* 800-812, 1962.
- MAISIN, J. H. F. - Role of thymus and thymus factors in the induction of 20-methylcholanthrene: Skin cancer in mice. *Nature* 202, 202, 1964.
- MALTONI, C. en F. ZAJDELA - Chances of the subepithelial connective tissues in the early stages of skin carcinogenesis induced by chemical agents. *Acta Unio Internationalis Contra Cancrum* 29, 3-4, 1963.
- MARCHANT, J. en J. W. ORR - Further attempts to analyse the role of epidermis and deeper tissues in experimental chemical carcinogenesis by transplantation and other methods. *Brit. J. Cancer* 7, 329-341, 1953.
- MEISELS, A. - Influence of gonadal hormones on DMBA induced carcinoma of the cervix in mice. *Acta Cytol.* 8, 274-279, 1964.
- MENDELSON, M. L. - Chronic infusion of tritiated thymidine into mice with tumors. *Science* 135, 213-215, 1962.
- MENKIN, V. - Biological cocarcinogens. *Progr. Exper. Tumor Res.* 1, 279-310, 1960.
- MILLER, E. C. en J. A. MILLER - The presence and significance of bound aminoazo dyes in the livers of rats fed p-dimethyl-aminoazobenzene. *Cancer Res.* 7, 468-480, 1947.
- MILLER, J. A. en E. C. MILLER - Biochemical concepts of carcinogenesis. *Canad. Cancer Conf.* 4, 57-79, 1961.
- MILLER, J. F. A. P., G. A. GRANT en F. J. C. ROE - Effect of thymectomy on the induction of skin tumour by 3,4-benzpyrene. *Nature (London)* 199, 920-922, 1963.
- MONOD, J., J. P. CHANGEUX en F. JACOB - Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6, 306-329, 1963.
- MOTTEL, N. K. en C. McCOY - The stimulatory effect of heterologous fibroblasts on the growth of human carcinoma cells in situ. *Lab. Invest.* 13, 930-933, 1964.
- MUELLER, G. C., J. GERSKI en Y. AIZAWA - The role of proteins synthesis in early estrogen action. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 47, 164-169, 1961.
- MÜHLBOCK, O. - Hormones in the genesis of cancer. *Neoplasma* 10, 337-342, 1963.
- MÜHLBOCK, O. - De betekenis van hormonen voor de genese van kanker. *Ned. T. v. Geneesk.* 103, 949-952, 1959.
- MÜHLBOCK, O. - Nieuwe gegevens over de carcinogenese. *Ned. T. v. Geneesk.* 103, 2457-2460, 1959.
- MURPHY, E. D. - Studies on carcinogen-induced carcinoma of cervix in mice. *Am. J. Path.* 29, 608, 1953.
- MURPHY, E. D. - Carcinogenesis of the uterine cervix in mice. Effect of diethylstilboestrol after limited application of 3-methylcholanthrene. *J. Nat. Cancer Inst.* 27, 611-654, 1961.

- NIE, R. VAN, P. J. THUNG en O. MÜHLBOCK - Enkele bijdragen van de experimentele pathologie tot de oncologische begripsvorming. Ned. T. v. Geneesk. 107, 1593-1598, 1963.
- NIEBURGS, H. E. - Endocrine factors in cancer of the cervix uteri. Am. J. Obst. and Gynec. 62, 93-101, 1951.
- NISHIZUKA, Y., K. NAKAKUKI en M. USUI - Enhancing effect of thymectomy on hepatotumorigenesis in Swiss mice following neonatal injection of 20-methylcholanthrene. Nature 205, 1236-1237, 1965.
- NOTDRUFT, H. - Zur Theorie der primären Geschwulstursachen. Z. Krebsforsch. 56, 176-204, 1948.
- NOVAK, E. en E. R. NOVAK - Gynecologic and Obstetric pathology. W. B. Saunders Company (Philadelphia & London, 1958).
- ORGEL, L. E. - The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 49, 517-521, 1963.
- ORR, J. W. - The mechanism of chemical carcinogenesis. Brit. Med. Bull. 14, 99-100, 1958.
- PALETTA, F. K. en P. M. MAX - Influence of estradiolbenzoate on epidermal methylcholanthrene carcinogenesis. J. Nat. Cancer Inst. 2, 577-581, 1942.
- PAN, S. C. en W. U. GARDNER - Carcinoma of the uterine cervix and vagina in estrogen- and androgen-treated hybrid mice. Cancer Res. 8, 337-345, 1948.
- PEARSE, A. G. E. - Histochemistry theoretical and applied, 2ed, Churchill London 1960.
- PEASE, D. C. - Histological techniques for electron microscopy. Acad. Press Inc., New York 1960.
- PERROTTA, C. A. - Initiation of cell proliferation on the vaginal and uterine epithelia of the mouse. Am. J. Anat. 111, 195-201, 1962.
- PERRY, I. H. and L. L. GINZTON - The development of tumor in female mice treated with 1, 2, 5, 6-dibenzanthracene and theelin. Am. J. Cancer 29, 680-704, 1937.
- PETIT in MURRAY, J. A. - The zoological distribution of cancer. A. R. imp. Cancer Res. Fed. 3, 41-60, 1908.
- PIERCE, G. B., A. R. MIDGLEY en J. RAM - The histogenesis of basement membranes. J. Exp. Med. 117, 339-348, 1963.
- PIERCE, G. B. - Basement membranes. VI. Synthesis by epithelial tumors of the mouse. Cancer Res. 25, 656-670, 1965.
- PITOT, H. C. en C. HEIDELBERGER - Metabolic regulatory circuits and carcinogenesis. Cancer Res. 23, 1694-1700, 1963.
- PLANTEYDT, H. T. - Maag en maagcarcinoom, een histochemisch onderzoek. Diss., Leiden 1961.
- PLAUT, A. en A. KOHN-SPEYER - The carcinogenetic effect of smegma. Science 105, 391-392, 1947.
- POEL, W. E. - The cause and nature of cancer. Progr. exp. Tumor Res. 5, 53-84, Karger, Basel- New York, 1964.
- POTTER, V. R. - Biochemical perspectives in cancer research. Cancer Res. 24, 1085-1098, 1964.
- PRATT-THOMAS, H. R., H. C. HEINS, E. LATHAM, E. J. DENNIS en F. A. McIVER - The carcinogenic effect of human smegma; an experimental study. I. Preliminary report. Cancer N. Y. 9, 671-680, 1956.
- PRIEST, R. E. en R. M. J. KOPLITZ - Inhibition of synthesis of sulphated mucopolysaccharides by estradiol. J. exp. Med. 116, 565-573, 1962.
- RANADIVE, K. J., S. A. HAKIM en U. R. KHARKAR - Chemical induction of mammary cancer in pseudopregnancy. Brit. J. Cancer 14, 508-513, 1960.

- REAGAN, J. W. en W. B. WENTZ - Changes in the mouse cervix antecedent induced cancer. *Cancer* 12, 389-395, 1959.
- RINDANI, T. H. en H. SELEYE - Inflammation as influenced by a topical blockade of the reticulo-endothelial system. *Brit. J. Exp. Path.* 34, 674-680, 1953.
- ROE, F. J. C. - The development of malignant tumours of mouse skin after initiating and promoting stimuli. IV. The carcinogenic action of croton oil. *Brit. J. Cancer* 10, 72-78, 1956.
- DE ROM, F., M. THIERY, M. SCHRUYNS, M. DE GROODT en A. LA-GASSE - L'ultrastructure du cancer expérimental du col de l'utérus. *Gynéc. et Obstétr.* 58, 182-190, 1959.
- ROMEIS, B. - *Mikroskopische Technik*. Leibniz Verlag, München, 1948.
- ROSA, G. C. en J. T. VELARDO - Histochemical localization of vaginal oxidative enzymes and mucins in rats treated with estradiol and progesterone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 83, 122-144, 1959.
- ROUS, P. en J. G. KIDD - Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic states. A study of tar tumors in rabbits. *J. Exp. Med.* 73, 365-389, 1941.
- SALPETER, M. M. en M. SINGER - Differentiation of the submicroscopic adepidermal membrane during limb regeneration in adult triturus, including a note on the use of the term basement membrane. *Anat. Rec.* 136, 27-40, 1960.
- SANFORD, K. K. - Malignant transformation of cells *in vitro*. *International review of cytology* 18, 249-309, 1965.
- SCARPELLI en CARLETON in: SCARPELLI, D. G. en E. VON HAAM - Experimental carcinoma of the uterine cervix. *Progr. exp. Tumor Res.* 1, 179-224, 1960. Karger, Basel-New York.
- SCARPELLI, D. G. en E. VON HAAM - The effect of croton oil and carcinogens on mitosis and the deoxyribonucleic acid content of cervical epithelial cells. *Cancer Res.* 18, 657-663, 1958.
- SCARPELLI, D. G. en E. VON HAAM - Experimental carcinoma of the uterine cervix in the mouse. *Am. J. Path.* 33, 1059-1073, 1957.
- SCARPELLI, D. G. en E. VON HAAM - An electron microscopic study of 20-methylcholanthrene-induced dysplasia of the uterine cervix. *Acta Unionis Internationalis Contra Cancrum* 19, 670-673, 1963.
- SCARPELLI, D. G. en A. G. E. PEARSE - A cytochemical study of various oxidative enzymes in experimental carcinoma of the uterine cervix. *Trans Inter-Society Cytol. Council*, 2-8, 1958.
- SCHRODT, R. G. en C. D. FOREMAN - Methylcholanthrene-induced carcinoma of the mouse cervix: an electron microscope study. *Cancer Res.* 25, 802-812, 1965.
- SELEYE, H. - Effect of inflammation upon the growth of transplantable neoplasms as demonstrated by the „double granuloma-pouch” technique. *Brit. J. Cancer* 11, 550-553, 1957.
- SIRTORI, C. en E. MORANO - Cancer of the uterus. Charles C. Thomas Publ. Springfield, Illinois, 1963.
- SHE, M. P., LIU T.-H., CHANG P.-J., CHING F., SHEN, C. Y., LIN C.-M. en WU A.-J. - Urinary estrogens, pregnanediol, 17-hydroxycorticosteroid and gonadotropins in cervical carcinoma. *Acta Unio. Contra Cancrum* 20, 1117-1119, 1964.
- SHEAR, M. J. - Studies in carcinogenesis. *Am. J. Cancer* 33, 499-537, 1938.
- SHUBICK, P. - Studies on the promoting phase in the stages of carcinogenesis in mice, rats, rabbits and guinea pigs. *Cancer Res.* 10, 13-17, 1950.
- SMITH, F. W. - The relationship of inherited hormonal influence to the production of adrenal cortical tumours by castration. *Cancer Res.* 8, 641-648, 1948.

- SMITH, A. en T. C. JONES - Veterinary Pathology 1957 (Lea & Febiger, Philadelphia).
- STEIN-WERBLOWSKI, R. - Induction of cancer of the cervix uteri in relation to the estrous cycle. Brit. J. Cancer 14, 300-305, 1960.
- STERNBERG, S. S. - Carcinoma in situ of the cervix in a monkey (*Macaca mulatta*). Am. J. Obst. and Gynec. 82, 96-98, 1961.
- STOCKARD, S. R. en PAPANICOLAOU - The existence of a typical oestrus cycle in the guinea pig. Am. J. Anat. 22, 225-284, 1917.
- SWANN, M. M. - The control of cell division: a review. II. Special mechanisms. Cancer Res. 18, 1118-1160, 1958.
- TALALAY, P. en H. G. WILLIAMS-ASHMAN - Activation of hydrogen transfer between pyridine nucleotides by steroid hormones. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 44, 15, 1958.
- TANNENBAUM, A., S. D. VESSELINOVITCH en H. SILVERSTONE - Increased induction of skin tumour by pretreatment with croton oil. Cancer Res. 24, 361-366, 1964.
- TEE, D. E. H., M. WANG en J. WATKINS - Antigenic properties of human tumours. Nature 204, 897-898, 1964.
- THIERY, M. - Bijdrage tot de kennis van het experimentele cervico-vaginale carcinoom. Arschia Uitgaven N.V. Brussel, 1962.
- THIERY, M. en R. G. J. WILLIGHAGEN - 5-nucleotidase activity in experimental cervicovaginal carcinoma of the mouse. Nature 194, 691, 1962.
- THIERY, M. en R. G. J. WILLIGHAGEN - Enzyme histochemistry of induced and transplanted squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Brit. J. Cancer 18, 582-591, 1964.
- TOUSTANOVSKY, A. A. en J. M. VASILIEV (1957) - gerefereerd door J. M. Vasiliev. Brit. J. Cancer 12, 524-536, 1958.
- TRAININ, N. - Adrenal imbalance in mouse skin carcinogenesis. Cancer Res. 23, 415-419, 1963.
- TRAININ, N., A. M. KAYE en I. BERENBLUM - Influence of mutagens on the initiation of skin carcinogenesis. Biochem. Pharmacol. 263-267, 1964.
- TWORT, J. M. en C. C. TWORT - Comparative activity of some carcinogenic hydrocarbons. Am. J. Cancer 35, 80-85, 1939.
- UI, H. en G. C. MUELLER - The role of RNA synthesis in early estrogen action. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 50, 256-260, 1963.
- VANDEPUTTE, M., P. DENYS, R. LEYTEN en P. DE SOMER - The oncogenic activity of the polyoma virus in the thymectomised rats. Life Sci. 7, 475-478, 1963.
- VASILIEV, J. M. - The role of connective proliferation in invasive growth of normal and malignant tissues: a review. Brit. J. Cancer 12, 524-536, 1958.
- VASILIEV, J. M., L. V. OLSHEVSKAJA, N. RAIKHLIN en O. J. IVANOVA - Comparative study of alterations induced by 7, 12-dimethyl-anthracene and polymer fibres in the subcutaneous connective tissue of rats. J. Nat. Cancer Inst. 28, 515-560, 1962.
- VILLEE, C. A. - Estrogens and uterine enzymes. Ann. N. Y. Acad. Sci. 75, 524, 1959.
- WALKER, B. E. - Renewal of cell populations in the female mouse. Am. J. Anat. 107, 95-106, 1960.
- WATSON, J. D. en F. H. C. CRICK - A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171, 737-738, 1953.
- WATSON, J. D. - Involvement of RNA in the synthesis of proteins. Science 140, 17-26, 1963.
- WEERING, J. VAN - De invloed der geslachtshormonen op het epitheel van de uterus en vagina. Diss. Groningen 1933.

- WEINSTEIN, L., W. U. GARDNER en E. ALLEN - The effect of estrogenic hormones on the bacterial content of the uterus. *Yale J. Biol. Med.* 16, 43-51, 1943.
- WIEBERDINK, J. - Over metastasering van kanker. Diss. Groningen, 1950.
- WILLIAMS, W. L., K. PAULLUS en C. C. ERICKSON - Proliferative epithelial changes and carcinoma of cervix and vagina in mice with prolonged administration of alphaestradiol sensitized collodion particles. *Proc. Am. A. Cancer Res.* 1, 60-61, 1953.
- WOLFSON, N. I. - Histogenesis and pathogenesis of experimental carcinoma of the uterine cervix. *Acta Unio Int. Contra Cancrum* 19, 678-679, 1963.
- WOODRUFF, M. F. A. - Immunological aspects of cancer. *The Lancet* II, 265-269, 1964.
- WOOLLEY, G. W. - Experimental endocrine tumors with special reference to the adrenal cortex. *Recent Progr. Hormone Res.* 5, 383-405, 1950.
- YAMAGIWA, K. en K. ISCHIKAWA - Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. *Am. J. Cancer* 3, 1-29, 1918.
- ZAWARSIN, A. A. - 1925, 1927, gerefereerd door J. M. Vasiliev, *Brit. J. Cancer* 12, 524-536, 1958.
- ZEIDMAN, I. - Metastasis: A review of recent advances. *Cancer Res.* 17, 157-162, 1957.